

Elektrische Anregung von Zellsystemen mittels einer zweidimensionalen Elektrodenstruktur



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Phys. Antje Reiher
geb. am 24.07.1978 in Stendal

1. Gutachter	Prof. Dr. rer. nat. habil. Alois Krost
2. Gutachter	Prof. Dr. rer. nat. habil. Martin Stutzmann
3. Gutachter	Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas Voigt
eingereicht am	24.04.2007
verteidigt am	24.09.2007

Meinen Eltern

Kurzbeschreibung

Das Ziel der Arbeit war die Entwicklung einer einfachen, planaren Stimulationselektrode, die in verschiedenen biologischen System einsetzbar ist. Die Konzeptionierung der ineinandergreifenden Elektroden erfolgt dabei unter Berücksichtigung der Notwendigkeit von optischer Transparenz, elektrischer Leitfähigkeit, Bioverträglichkeit und Spannungsfestigkeit aufgrund experimenteller Randbedingungen. Als optimierter Schichtaufbau wird eine mittels Elektronenstahlverdampfen hergestellte 50 nm dünne Goldschicht auf einer 5 nm dünnen Titan-Haftschrift experimentell bestimmt.

Das elektrische Verhalten des Systems, bestehend aus Elektroden, Elektrolyt und Zellen, wird für Gleich- und Wechselspannungen frequenzabhängig analysiert. Mit Hilfe eines sukzessiv optimierten Ersatzschaltbildes werden die Impedanzmessungen modelliert und Wechselwirkungsvorgänge charakterisiert.

Die vielseitige Anwendbarkeit der Stimulationselektrode wird anhand von zwei unabhängigen biologischen Systemen, dissoziierten Neuronennetzwerken und suspensierten Hefezellen, durch Bestimmung der Stimulationsparameter (Pulsbreite, Pulsamplitude und Flankensteilheit) demonstriert.

Eine synchrone Netzwerkanregung von dissoziierten Neuronenkulturen wird durch Anlegen eines biphasigen, rechteckigen 10fach-Pulses der Amplitude ± 2.2 V und der Pulsbreite 1 ms erreicht. Eine gezielte Untersuchung des Anregungsmechanismus von Einzelneuronen ist durch das Blockieren der Glutamat- und GABA_A-Neurotransmitterrezeptoren in speziell strukturierten Netzwerken möglich. So wird in Netzbereich, 1.5 mm entfernt von den Elektroden, eine axonale Anregung (antidrome Stimulation) in dissoziierten Kulturen nachgewiesen. Es stellt sich heraus, dass die Anregungseffizienz direkt mit der Axondichte über den Elektrodenkanten, dem Ort des höchsten Potentialgradienten, korreliert.

Durch eine Stimulation mit einzelnen, biphasigen, rechteckigen Pulsen der Amplitude ± 11 V und der Pulsbreite 4 ms kann der Stoffwechsel von Hefezellen beeinflusst werden. Zusätzlich kann die Elektrode zur elektrischen Detektion der glykolytischen Oszillationen von Hefezellen, hervorgerufen durch periodische Änderungen der Systemimpedanz oder der Membranleitfähigkeit, und von Hefeextrakt, verursacht durch Konzentrationsänderungen von Zuckerphosphaten, verwendet werden.

Abstract

A simple, planar interdigitated stimulation electrode for applications in different biological environments was developed considering essential experimental boundary conditions, i.e. optical transmission, electrical conductivity, withstand voltage and biocompatibility. Experimental results suggest an electrode structure of an 5 nm thin Titan-undercoating followed by a 50 nm thin gold layer deposited by electron beam evaporation.

The experimental setup consisting of a metal electrode, an electrolyte and living cells are electrically characterized for frequency dependent direct and alternating voltage. The successively defined equivalent circuit allows a simulation of the measured impedance to analyze the discrete influence of the electrode, the electrolyte or the biological component and their interdependencies.

Two different biological systems are used to demonstrate the variable adaptability for stimulation experiments. Infect, dissociated neural networks and suspended yeast cells are investigated to determine the excitation parameters, i.e. pulse amplitude, pulse width, and edge steepness.

Synchronous neural network activity is evoked by stimulation with biphasic, 10fold square pulses of an amplitude of ± 2.2 V and a pulse width of 1 ms. To analyze the excitation mechanism of single neurons, the present superposed neural activity of directly stimulated neurons and of mediately activated neurons due to synaptical signal transmission has to be distinguished. After blocking the synaptic activity by an addition of antagonists to the glutamate and GABA_A receptors, only direct electrical excitation occurs. Since in synaptically blocked networks that are located 1.5 mm far from the electrode neural activity is observed after an electrical excitation, antidromic stimulation has to be occurred. The stimulation efficiency correlates with the axonal density across the electrode edges, which is the region of highest potential gradient.

The energy metabolism of yeast cells is affected by electrical excitation of single, biphasic square pulses with an amplitude of ± 11 V and a pulse width of 4 ms. Additionally, the electrode offers the possibility of an electrical investigation of glycolytic oscillations of yeast cells and yeast extract. Thus, these electrically measured oscillation effects could be correlated to changes in the system impedance or in the membrane conductivity of yeast cells as well as to periodic concentration changes of ionic and dipole compounds from glycolytic intermediates of yeast extract.

Danksagung

Diese Arbeit ist durch die interdisziplinäre Zusammenarbeit von vier Arbeitsgruppen entstanden. Daher möchte ich mich persönlich bei allen bedanken, die zum Gelingen beigetragen haben:

Prof. Alois Krost für die Möglichkeit, ein völlig neues Forschungsthema in Angriff zu nehmen, für seine konstruktiven Hinweise und sein Vertrauen in meine Arbeit,

Prof. Thomas Voigt, der einer Physikerin den Zugang zu Neuronen ermöglichte, für die Bereitstellung des Versuchsplatzes und die Diskussion der Ergebnisse,

Prof. Martin Stutzmann, für die Begutachtung dieser Arbeit,

Prof. Frank Ohl, der mir Gelegenheit für erste Untersuchungen *in vivo* gab und mich für den Anregungsmechanismus sensibilisierte,

Prof. Rainer Clos für sein Interesse an meinem wissenschaftlichen und persönlichen Vorankommen,

Dr. Hartmut Witte für die kritische Diskussion der elektrischen Aspekte,

Dr. André Krtschil, der großen Anteil nicht nur an der wissenschaftlichen Entwicklung dieser Arbeit hatte,

Dr. Thomas Mair für die Bereitstellung der Hefekulturen und seine Geduld beim Erklären der Glykolyse,

Dr. Ana D. de Lima, die mir unterschiedliche Aspekte neuronaler Aktivität erläuterte und besonders für die konstruktiven Hinweise zum wissenschaftlichen Arbeiten,

Dr. Thoralf Opitz für die ersten gemeinsamen Stimulationsexperimente und die Einführung in das Ca^{2+} -Imaging,

Dr. Julia Kluewa, die völlig unkompliziert die Patch-Clamp-Versuche durchführte,

Dr. Matthias Deliano für die Implantationsversuche an Gerbils und die Diskussionen über elektrische Stimulation und Neurotransmitterantagonisten wie TTX, PTX, APV, CNQX und BMI,

Dr. Ulrich Schreppel und Ulrike Kühne, die mir die Messungen mit der *Nicolet* ermöglichten,

Dipl.-Phys. Stephan Radoch für die Impedanzmessungen, persönliche Unterstützung und das Drängen zum Klettersport (Dank auch an seine Frau Melanie),

Dipl.-Phys. Christian Warnke, der mich immer mit frischen Hefezellen versorgte, den Versuchsplatz der Hefezellen aufbaute und mir erläuterte; unvergessen bleiben wird das "Halt durch" in jeder möglichen Situation,

Dipl.-Phys. Annette Diez für ihre Hilfe bei so vielen Dingen, wie z.B. einem kaputten Mask Aligner, einem unter Wasser stehenden Labor, einem mit Wasser gefluteten Rezipienten, dem Finden und Wechseln von defekten Sicherungen der Ebeam usw.,

Marietta Hinz, die kleinste Halbleiterproben für Implantationsversuche präparierte,

Birgit Adam und Sabine Mücke für ihre unendliche Geduld bei der Neuronenpräparation auf den Goldelektroden,

Olaf Born, den ich meist in seiner Frühstückspause störte und der trotzdem alle möglichen unmöglichen Lötarbeiten zur Fertigstellung meiner Probenhalterungen durchführte,

dem Werkstattteam unter Leitung von Jürgen Weißenborn, welches alle Mikroskophalter anfertigte – bis hin zum "Schweinerl"!

Dr. Jürgen Bläsing, der während der gesamten Zeit immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte,

Dr. Frank Bertram und Dr. Till Riemann, die mir in schweren Zeiten Beistand leisteten,

Dipl.-Phys. Fabian Schulze für ungezählte Gespräche und Abende, die weit über das Maß an wissenschaftlichem Austausch hinausgingen $\sum_{k=1}^{10} k^2 = 385$,

Martin Zornemann, der mehr Anteil an dieser Arbeit hat, als er es für möglich hält,

Anke, Alex und Zozi nicht nur als Kletterpartner, sondern als Freunde,

meinen Eltern, die immer an mich geglaubt haben,

Heiko, ohne den diese Arbeit nicht geschrieben worden wäre.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Motivation.....	5
2. Grundlagen.....	11
2.1. Elektrische Grundlagen.....	11
2.1.1. Einfluss verschiedener Parameter auf die Stimulationsbedingungen der Neuronen bei Verwendung einer Nadelelektrode	12
2.1.2. Ineinander greifende Elektroden / Fingerelektroden.....	13
2.1.3. Phasengrenze Metall-Elektrolyt.....	13
2.1.4. Gouy-Chapman-Theorie.....	17
2.1.5. Ableitung der Gouy-Chapman-Kapazität.....	19
2.2. Pulseinkopplung in neuronale Netzwerke.....	22
2.2.1. Spezielle Modelle.....	22
2.2.2. Dynamische Einflüsse der angelegten elektrischen Felder auf Zellen und Elektrolyt	32
2.3. Biologische Grundlagen.....	34
2.3.1. Aufbau von Neuronen.....	34
2.3.2. Entstehung eines Aktionspotentials	35
2.3.3. System der Hefezellen.....	40
2.3.4. Energiestoffwechsel der Hefezellen.....	41
2.3.5. Glykolytische Oszillationen von <i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	43
2.3.6. Impedanzmessungen an Hefezellen	44
3. Versuchsaufbau.....	45
3.1. Herstellung der Metallelektroden.....	45
3.1.1. Bemerkungen zur Lithografie.....	47
3.1.2. Bestimmen des Parametersatzes für die Lithografie.....	49
3.2. Elektrische Methoden	52

3.3. Kultivierung von Neuronen.....	54
3.3.1. Präparation der Neuronen.....	54
3.3.2. Calcium-Fluoreszenz-Technik (Ca ²⁺ -Imaging).....	57
3.3.3. Stimulation der Neuronen.....	59
3.3.4. Auswertung der Ergebnisse.....	61
3.4. Präparation der Hefezellen <i>Saccharomyces carlsbergensis</i>.....	62
3.4.1. Hefezell- und Hefeextraktgewinnung	62
3.4.2. Beschreibung des Versuchsplatzes.....	65
4. Charakterisierung von Elektroden, Elektrolyt und Zellen.....	67
4.1. Überprüfung des Ausgangssignals.....	68
4.2. Die Stimulationselektroden.....	69
4.2.1. Materialwahl und Geometrie.....	69
4.2.2. Beschreibung der Elektrodenstruktur durch ein Ersatzschaltbild	72
4.3. Die Wechselwirkung von Elektroden und Elektrolyt.....	75
4.3.1. Charakterisierung des Elektrolyten	75
4.3.2. Die elektrochemische Doppelschicht.....	77
4.3.3. Charakterisierung von Elektrodenarray und Elektrolyt	80
4.4. Impedanzmessungen an Elektroden, Elektrolyt und Zellen.....	83
4.5. Feldverteilung im Elektrolyten.....	85
5. Anregung von biologischen Systemen.....	89
5.1. Anregungsmechanismus von Neuronen.....	89
5.1.1. Bestimmung der Stimulationsparameter von Netzwerken.....	89
5.1.2. Bestimmung der Stimulationsparameter für Einzelzellanregung.....	95
5.1.3. Analyse des Anregungsmechanismus von Neuronen.....	99
5.1.4. Langzeitstimulation im Inkubator.....	106
5.1.5. Anregung mit Mikroelektroden.....	109
5.2. Stimulation von Hefezellen.....	111
5.2.1. Bestimmung der Stimulationsparameter von Hefezellen	113
5.2.2. Detektion der glykolytischen Oszillationen.....	117
5.3. Untersuchungen zur Bioverträglichkeit.....	122
6. Zusammenfassung.....	127
7. Literatur.....	131

<u>8. Anhang.....</u>	<u>145</u>
<u>8.1. Ätzen der Oberfläche der Deckgläschen.....</u>	<u>145</u>
<u>8.2. Zusammensetzung der Kulturmedien der Neuronen.....</u>	<u>145</u>
<u>8.3. Zusammensetzung der Nährmedien für die Hefekulturen</u>	<u>148</u>
<u>8.4. Ergänzungen zur elektrischen Charakterisierung</u>	<u>150</u>
<u>8.5. Einfluss der Flankensteilheit auf die Anzahl angeregter Neuronen....</u>	<u>151</u>
<u>8.6. Dauerstimulationsexperimente</u>	<u>152</u>
<u>Lebenslauf.....</u>	<u>155</u>
<u>Publikationsliste.....</u>	<u>157</u>
<u>Eidesstattliche Erklärung.....</u>	<u>159</u>

1. Einleitung und Motivation

Die Anwendung von Stimulationselektroden als therapeutisches Mittel in der Humanmedizin hat sich seit der Entdeckung der spannungsabhängigen Kontraktion von Muskeln durch *Galvani* [Galvani, 1791] etabliert. Das klassische Beispiel für die Verwendung von Stimulationselektroden ist wohl der Herzschrittmacher. Die fortwährende Anpassung seit den ersten erfolgreichen Anwendungen 1872 [Green, 1872] führte schließlich zu der Kombination von transvenösen Elektroden und implantiertem Herzschrittmacheraggregat [Ekeström, et al., 1962]. Diese Art des Herzschrittmachers ermöglicht es heute unzähligen Patienten, in jedem Lebensalter mit ihren bradykarden Herzrhythmusstörungen, weitgehend ohne Beeinträchtigung zu leben [Böttcher et al., 2003]. Eine Entwicklung von ähnlicher Bedeutung wie die des Herzschrittmacher wäre die eines Retina-Implantats. Im März 2007 wurde die erste klinische Studie vorgelegt, in der Blinde nach Implantation einer Prothese erfolgreich Gegenstände und Muster erkennen konnten [Gekeler und Zrenner, 2005; Pressemitteilung Retina Implant GmbH, 2007]. Elektrische Felder, die über Elektroden appliziert werden, finden beispielsweise auch Anwendung in der Therapie von Knochenfrakturen [Rubin et al., 1993; Habel, 2004]. Neben Blasenimplantaten [Barrington et al., 2005] spielen chronisch implantierte Elektroden für die Verringerung von Symptomen der Parkinsonschen Krankheit [Obeso, 1997; Yelnik et al., 2000; McCreery, 2006] oder dem essentiellen Tremor eine große Rolle [Javidan et al., 1992].

Die bisher beschriebenen Stimulationselektroden finden ausschließlich in der therapeutischen Humanmedizin Anwendung, um Krankheitssymptome zu verringern. Aber auch bei der Überprüfung von Organfunktionen oder der Früherkennung von Krankheitsbildern werden Elektroden eingesetzt. So gehören neurophysiologische Analysen der elektrischen Muskelaktivität (Elektro-Myographie, EMG), der Gehirnströme (Elektro-Enzephalographie, EEG) oder der rhythmischen Aktivität der Herzmuskelfasern (Elektrokardiogramm, EKG) mittlerweile zu den Standarduntersuchungen [Birbaumer et al., 2004]. Im Gegensatz zu den chronischen Implantaten, die durch Stimulation eine therapeutische Wirkung aufweisen, werden die EMG-, EEG- oder EKG-Elektroden ausschließlich zur Detektion von

elektrischen Signalen eingesetzt. Bevor jedoch Elektroden präzise in der Humanmedizin eingesetzt werden können, ist eine genaue Kenntnis der grundlegenden biologischen und physikalischen Wechselwirkung Voraussetzung.

Da bei vielen Krankheiten die Ursache in einer veränderten Signalverarbeitung im Gehirn zu suchen ist, wird versucht, die elektrische Aktivität zu analysieren. Ursachen für epileptische Anfälle oder Epilepsie sind zum einen die Hyperexzitabilität von Nervenzellen, zum anderen eine abnorme gleichzeitige elektrische Aktivität von größeren Netzwerken. Es wird angenommen, dass aufgrund fortgesetzter Erregung Elektrolytungleichgewichte hemmende GABA-verwendende Synapsen in erregende Synapsen umgewandelt werden, und so ein Ungleichgewicht von Erregung und Hemmung entsteht [Kandel et al., 2000]. Um die Überaktivität von Hirnregionen, die zu einem Zusammenkrampfen einzelner Muskeln oder des gesamten Körpers führen, zu verringern, gibt es verschiedene Ansätze. Resektionen und Durchschneidungsverfahren sind dabei genauso etabliert wie eine medikamentöse Behandlung oder die Implantation eines "Hirnschrittmachers" [Lüders, 2004; Yamamoto et al., 2006]. Anders als bei der Epilepsie liegt bei Taubheit eine gestörte Signalweiterleitung der Haarzellen vor. Die ankommenden Schallwellen werden nicht in Aktionspotentiale umgewandelt und erreichen den Hörnerv, die Cochlea, nicht. Da jedoch 99% aller Gehörlosen mit zerstörten Hörsinneszellen eine funktionierende Cochlea besitzen [Hannoversche Cochlear-Implant-Gesellschaft, 2000], kann mittels elektrischer Stimulation der Hörsinn wiedererlangt werden. Bei den Implantaten ist eine hohe Elektrodenanzahl und eine genaue Positionierung anzustreben, so dass spezifische Nervenzellen stimuliert und damit ein breiteres Frequenzband erfasst werden kann [Lenarz et al., 2001; Briggs et al., 2005].

Die genannten Beispiele zeigen, dass nur das Erkennen und Verstehen der Fehlfunktionen des Gehirns eine gezielte Therapie ermöglichen. Aufgrund der Komplexität der Signalverarbeitung des Gehirns ist bisher nur ein Bruchteil der Signalverarbeitung analysiert und erfasst. Um mehr über die verschiedenen Mechanismen und Funktionen des Gehirns zu erfahren, wird an Modellsystemen geforscht. Diese Modellsysteme werden hinsichtlich des Aufbaus und der Komplexität so gewählt, dass Fragestellungen und Probleme aus dem Gehirn übertragbar sind. So bilden zweidimensionale, dissoziierte Neuronennetzwerke meist den Ausgangspunkt der Forschungen, da diese *in vitro*-Kulturen relativ einfach und in hoher Anzahl herzustellen und zu untersuchen sind. Da die Komplexität dieser Neuronennetzwerke begrenzt ist, werden Experimente an akuten Hirnschnitten (Slices) oder in Versuchstieren (*in vivo*) durchgeführt, um dem tatsächlichen Aufbau des Gehirns näher zu kommen. Aufgrund der Unterschiede der vorgestellten Versuchsobjekte werden jeweils spezifische Elektroden zur Stimulation und Ableitung verwendet.

Obwohl in dissoziierten Netzwerken und Hirnschnitten nach wie vor Glaspipetten (Patch-Elektroden) für Experimente verwendet werden, gewinnen andere neuartige Elektrodenarten an Bedeutung. Grund hierfür könnte sein, dass die Glaspipetten intrazellulär platziert werden müssen. Die sehr gute Signalqualität der gepatchten Zellen und die hohen Signalamplituden von 70 mV stehen der Tatsache gegenüber, dass eine Ableitung oder Stimulation des entsprechenden Neurons nur über einige Stunden möglich ist. Weiterhin ist die Anzahl der gleichzeitig verwendbaren Glaselektroden in der Regel auf zwei begrenzt, so dass keine Neuronennetzwerke untersucht werden können [Borkholder, 1998; Regehr et al., 1988].

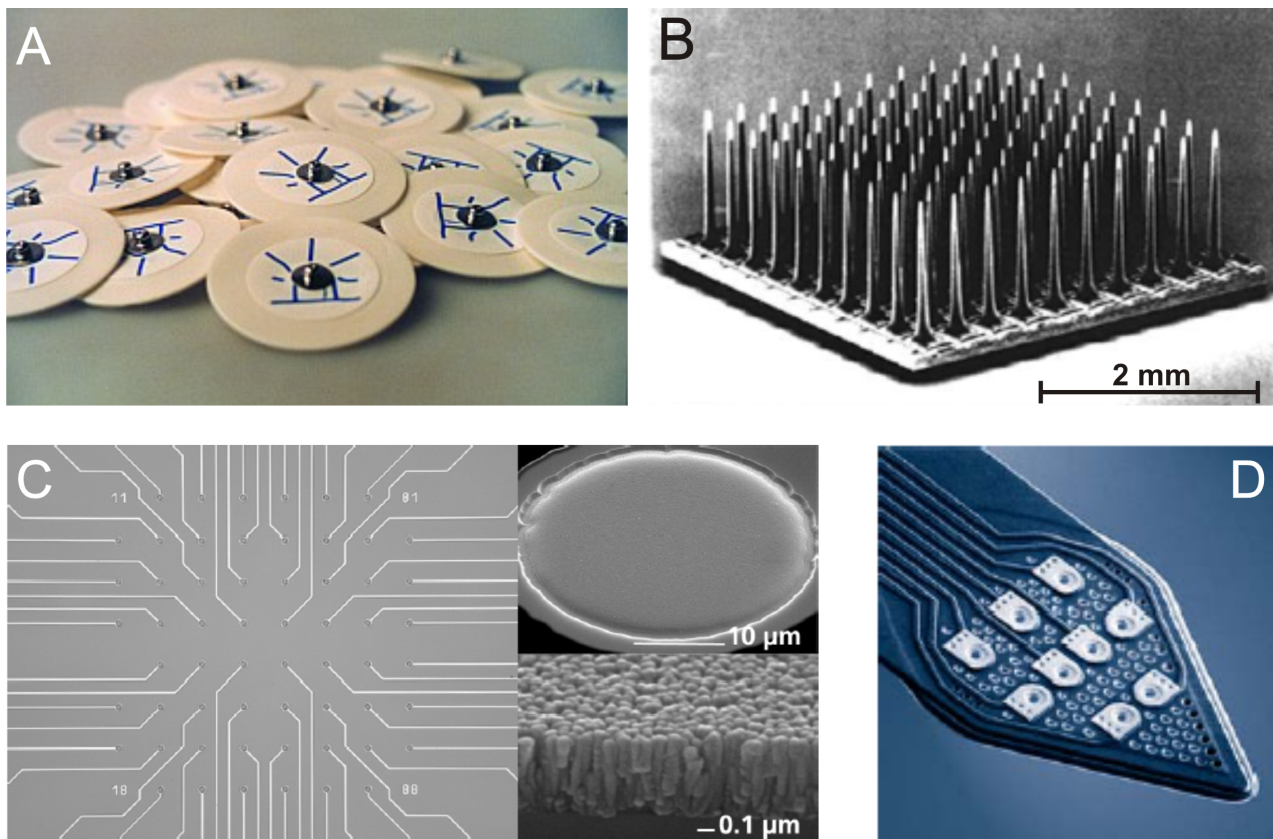


Abb. 1.1: Verschiedene Elektrodentypen;
A) EKG-Elektroden [meetB],
B) UTAH-Elektrode [Aoyagi et al., 2003],
C) Feld mit 60 Mikro-Elektroden (MEA) [Multi Channel Systems],
D) spezielles Elektrodendesign [NeuroNexus Technologies]

Mit Hilfe von extrazellulären Elektroden (vgl. Abb. 1.1) sind Stimulation und Detektion ebenfalls möglich. Aufgrund einer chronischen Verbindung zwischen Elektrode und Neuron(en) *in vivo*, in Slices und auch *in vitro* besteht die Möglichkeit, Experimente an einer Neuronenstruktur über einige Monate hinweg durchzuführen. Die einsatzspezifische Anpassung der extrazellulären Elektroden eröffnet so ein breites Anwendungsfeld für Forschungen, die für Glaspipetten nicht zugänglich sind.

Die häufigsten extrazellulären Elektroden besitzen eine planare [Maeda et al., 1995] oder eine dreidimensionale Struktur [Rousche und Normann, 1998]. Für komplexe Hirnstrukturen mit einem Schichtaufbau eignen sich 3d-Elektroden besser für Stimulations- und Ableitsprozesse, weil so tieferliegende Zellen kontaktiert werden und sich strukturell bedingte Aktivitäten der Signalverarbeitung analysieren lassen. Da sich bei akuten Hirnschnitten in den Randschichten abgestorbene Zellen befinden, die die Amplitude der Zellsignale reduzieren, ist eine direkte Kontaktierung der aktiven Neuronen wünschenswert [Heuschkel et al., 2002]. Daher werden hauptsächlich Nadelelektroden [Thiele et al., 2006], Nadelarrays (UTAH-Elektrode) [Rousche und Normann, 1998] und 3d-Multi-Elektroden-Arrays [Heuschkel et al., 2002] in Slices oder *in vivo* eingesetzt. In den relativ einfachen Neuronenstrukturen eines *in vitro*-Netzwerkes treten bereits sehr komplexe Prozesse der Signalverarbeitung auf, weshalb dieses Elektrodensystem in der Forschung sehr verbreitet ist. Da es sich hierbei um ein zweidimensionales Netzwerk handelt, sind keine 3d-Elektroden für die Stimulation und Ableitung notwendig. Aufgrund unterschiedlichster Ansprüche an planare Elektroden sind diverse Elektroden etabliert bzw. werden neue Materialsysteme erprobt. So werden beispielsweise Transistoren auf Silizium-[Schoen und Fromherz, 2005] oder AlGaN-Basis [Steinhoff et al., 2005] für einzelne Schnecken-Neuronen bzw. Herzzellen für Anwendungen getestet. Andererseits werden Elektroden aus Edelmetallen wie Gold oder Platin [Robblee et al., 1983; Geddes und Roemer, 2001; 2003] verwendet. Am häufigsten werden jedoch Multi-Elektroden-Arrays (MEAs), z.B. der Firma Multi Channel Systems, verwendet [Rutten et al., 2001, Eytan et al., 2003, Wagenaar et al., 2004].

Ein Vorteil der MEA-Strukturen ist, dass durch den geringen Elektrodendurchmesser von minimal 10 μm [Multi Channel Systems] ein Neuron im Idealfall eine Elektrode abdeckt. So kann mit ähnlicher Präzision einer Patch-Elektrode gezielt ein Neuron stimuliert und seine Aktivität analysiert werden. Eine geringe Elektrodenfläche ist jedoch mit einer Erhöhung der Impedanz und einem erschwerten Ladungsausgleich verbunden, was die Signaldetektion aufgrund des geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses erschwert. Um die Zellaktivität mit einem geringen Rauschanteil aufzunehmen, muss bei einer sehr kleinen Elektrodenfläche die effektive Oberfläche vergrößert werden [Kovacs, 1994]. Dies kann beispielsweise durch das Aufwachsen einer dünnen TiN-Schicht auf die Elektroden [Multi Channel Systems] oder das Abscheiden von Goldelektroden auf polykristallinem Silizium [Paik et al., 2003] geschehen. Die Analyse der elektrischen Aktivität von Neuronen gestaltet sich zum Teil schwierig, da die Signale eine große Variabilität aufweisen. Trotz der weit verbreiteten Verwendung der MEAs, fehlen geeignete Modelle, welche die unterschiedlichen Aktivitätsmuster von Einzelneuronen oder Neuronennetzwerken hinreichend erklären und präzise Interpretationen zulassen [Martinoia et al., 2004]. Es gibt Ansätze, in denen die Zellsignale nach bestimmten Kriterien, d.h. Spike-Länge, Spike-Abstand, Burst-

Länge, Burst-Abstand, Anzahl von Spikes und Burst usw., untersucht werden, um Rückschlüsse auf den Ursprung der Zellaktivität zu erhalten [Egert et al., 2002]. Dabei kann die Zugabe bestimmter Neurotransmitterantagonisten oder -agonisten eine Inhibition oder verstärkte Aktivität hervorrufen. Damit können selektiv Fragestellungen bearbeitet werden [Wagenaar et al., 2004; Steidl et al., 2006]. Eine weitere Möglichkeit, die vielfachen Antwortmuster zu analysieren, bietet die Verwendung eines physikalisch motivierten Ersatzschaltbildes. Dabei setzt sich das Ersatzschaltbild aus Einzelkomponenten zusammen, die spezielle Teile des Interfaces, wie das Neuron selbst, die Synapsen, die Metallelektrode und die Verbindung von Elektrode und Neuron, darstellen. Durch eine Variation der Modellparameter bis zu einer Übereinstimmung von Simulation und Messung können Rückschlüsse auf den Einfluss bestimmter biologischer Komponenten auf das detektierte Signal gezogen werden [Paik et al., 2003]. Bei der Aufnahme und der Auswertung der elektrischen Zellsignale ist darauf zu achten, dass die gemessene Signalform nicht durch den gewählten Messaufbau aufgeprägt wird [Wrobel et al., 2007].

Ein Nachteil der Multi-Elektroden-Arrays ist, dass diese sich nur in Kombination mit spezifischer Elektronik (Stimulationsgeneratoren, Verstärkern) und Software verwenden lassen. Darüberhinaus erfordert die Fabrikation der MEAs umfangreiche Herstellungsverfahren, die hauptsächlich in der Siliziumtechnik genutzt werden [Nisch et al., 1994; Novak und Wheeler, 1988], so dass eine eigene Fabrikation sehr aufwendig ist. Da die maximale räumliche Ausdehnung eines MEAs auf $4.5 \times 4.5 \text{ mm}^2$ beschränkt ist [Multi Channel Systems], können im Vergleich zum Gehirn nur sehr begrenzte Netzwerke untersucht werden. Trotz dieser Einschränkungen werden die Multi-Elektroden-Arrays vielfach angewendet. Es muss jedoch die Frage gestellt werden, ob nicht auch einfache Mittel genügen, um eine Schnittstelle von biologischen Strukturen und Elektronik zu etablieren, welche die Untersuchung von komplexen Problemen zulässt.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, eine einfache Stimulationselektrode zu entwickeln, mit der interessante Fragestellungen aus dem Bereich der Zellphysiologie bearbeitet werden können, die zum weiteren Verständnis der Signalverarbeitung in Netzwerken beiträgt. Dabei soll die zu entwickelnde Elektrode im Gegensatz zu MEAs die Möglichkeit bieten, sowohl einzelne Neuronen als auch ganze Neuronennetzwerke im Zentimeterbereich zu stimulieren und unkompliziert mit etablierter Elektronik anzuwenden sein. Ein Grundstein für die Anwendung der entwickelten Elektrode in der Forschung ist die genaue Kenntnis der Signaleinkopplung in das Gesamtsystem. Dazu muss die neue Elektrode hinsichtlich ihrer physikalischen Eigenschaften charakterisiert und optimiert werden. Die generelle Einsatzfähigkeit der Elektroden soll am Beispiel der Stimulation von zwei verschiedenen Zelltypen überprüft werden. Grundlage dafür bildet die Bestimmung der Stimulationsparameter. Der vorliegende Anregungsmechanismus der beiden verwendeten

Zelltypen soll charakterisiert und mit bekannten Mechanismen verglichen werden. Mit den durchgeführten Analysen soll ein Verständnis der Stimulationsvorgänge erreicht werden, damit die entwickelte Elektrode für spezifische wissenschaftliche Fragestellungen von Forschungsgruppen angewendet werden kann.

Die Einkopplung von elektrischen Signalen in einen Elektrolyten wird maßgeblich durch die elektrochemische Doppelschicht bestimmt, die sich ausbildet, wenn Metallelektrode und Elektrolyt in Kontakt zueinander kommen. Daher liegt neben der Charakterisierung der Metallelektrode und der Elektrolyten der Schwerpunkt in der Analyse der Doppelschicht. So wird das Gesamtsystem mit Hilfe von impedanzspektroskopischen Messungen analysiert und durch ein Ersatzschaltbild beschrieben. Der Einfluss von spezifischen Systemparametern auf das Frequenzverhalten des Gesamtsystems wird durch die Variation der Elektrolytstärke, des Systemvolumens und nach Zugabe von Zellen untersucht.

Von großem Interesse ist ebenfalls, welche Potentialverteilung im Elektrolyten bei dem Anlegen eines elektrischen Pulses an die Elektroden vorliegt. Mit Hilfe von orts aufgelösten Messungen und Simulationen wird der Potentialverlauf entlang der Elektroden detailliert analysiert, um Bereiche mit hohen und geringen Potentialen angeben zu können. Die Kenntnis der genauen Potentialverteilung erlaubt eine Aussage über die herrschenden Anregungsbedingungen.

Als Versuchs- bzw. Modellsysteme für die Elektroden werden einfache biologische Strukturen, z.B. suspensierte Hefezellen und dissoziierte Neuronennetzwerke, gewählt, um die Einkopplung von elektrischen Pulsen mit Hilfe der neu entwickelten Elektrode zu demonstrieren. Nach der Bestimmung des Parameterfensters für eine erfolgreiche Stimulation werden die Anregungsmechanismen sowohl von Hefenzellen als auch von Neuronen analysiert. Speziell für diese Fragestellung angefertigte Neuronennetzwerke, deren synaptische Signaltransmission durch Zugabe von Neurotransmitter-Antagonisten blockiert ist, werden zur Analyse des vorliegenden Anregungsmechanismus verwendet. Ein Modell, dass die Einflüsse der spezifischen biologischen Zellparameter und der Elektrodencharakteristika berücksichtigt und in Korrelationen zur lokalen Potentialverteilung steht, vervollständigt das Verständnis des Stimulationsprozesses.

2. Grundlagen

Ziel dieser Arbeit ist es, eine neuartige planare Elektrodenstruktur zur Stimulation von Zellsystemen zu entwickeln. Um eine Elektrode für Stimulationsexperimente zu konzipieren, müssen sowohl physikalische als auch biologische Aspekte beachtet werden. Um dem Leser einen Eindruck der Komplexität bei der Entwicklung einer Elektrode zu vermitteln, werden in Abschnitt 2.1. Effekte beschrieben, die eine große Bedeutung bei der Signaleinkopplung haben. Die elektrochemische Doppelschicht, die sich an der Phasengrenze Metall-Elektrolyt ausbildet, beeinflusst maßgeblich die elektrischen Eigenschaften der Gesamtsystems. Die Vorstellung einiger Modelle der Doppelschicht und der Signaleinkopplung in Neuronen sollen den Leser für diese Problematik sensibilisieren.

Im Abschnitt 2.2. werden die beiden verwendeten Zellkulturen, Neuronen und Hefezellen (*Saccharomyces carlsbergensis*), vorgestellt. Der Zellaufbau, spezifische Stoffwechselprozesse und Aktivitätsmuster, die für das Grundverständnis der Stimulation und der detektierten Zellantwort notwendig sind, werden ebenfalls dargelegt.

2.1. Elektrische Grundlagen

Die hier vorgestellten elektrischen Grundlagen geben einen allgemeinen Überblick über die Parameter, die bei der Stimulation von Neuronen wichtig sind. Einleitend werden die Nadelelektrode und eine Fingerelektrode, ähnlich der entwickelten, vorgestellt und kurz charakterisiert. Den Hauptteil dieses Kapitels bilden die Beschreibung der elektrochemischen Doppelschicht und Modelle der Signalübertragung in Neuronen. Einige Bemerkungen zu auftretenden Effekten bei der Pulseinkopplung über Elektroden in Elektrolyten beschließen diesen Abschnitt.

2.1.1. Einfluss verschiedener Parameter auf die Stimulationsbedingungen der Neuronen bei Verwendung einer Nadelelektrode

Für die medizinische und physiologische Grundlagenforschung ist die Verwendung von Nadelelektroden im Gehirn von Versuchstieren sehr verbreitet. Dabei wird eine spitze Nadelelektrode in ein komplexes Volumen, bestehend aus einem Elektrolyten, Zellkörpern, Dendriten und Axonen, platziert. Beim Anlegen eines Stimulationspulses an die Elektroden wird folglich eine unbestimmte Anzahl von Zellen angeregt [Ranck, 1975]. Um die neurale Aktivität zu beeinflussen und damit Krankheiten zu heilen, muss bekannt sein, welche Teile des Neurons bei einer Mikrostimulation im Gehirn angeregt werden. Experiment [Nowak und Bullier, 1998a,b] und Simulation [McIntyre und Grill, 1999] beschreiben einheitlich, dass ein Aktionspotential immer im Axon oder Axonhügel ausgelöst wird, wenn die Elektrode über dem Zellkörper liegt. Ein weiteres Ergebnis der Untersuchungen [McIntyre und Grill, 1999] ist, dass der Ort der höchsten Depolarisation nicht immer der Ort ist, von dem das Aktionspotential ausgeht. Weiterhin wird detailliert analysiert, wie sich die Schwellwerte für eine Stimulation mit dem Abstand von Elektrode zu Zelle und dem Ort der Stimulation ändern. Bei nicht punktförmigen, ausgedehnten Elektroden können diese Unterschiede vernachlässigt werden, da die Elektrode groß gegenüber den Neuronen ist und damit das elektrische Feld immer alle Bereiche der Zellen erreicht.

Lange Zeit war nur wenig über die räumliche Stromdichteverteilung auf der Elektrodenoberfläche, die Feldverteilung und über den Einfluss von Elektrodengeometrien und -eigenschaften auf die Anregung der Neuronen bekannt. Aus experimentellen Befunden geht hervor, dass die Elektrodengeometrie, d.h. die Größe und der Radius der Elektroden spitze, das elektrische Feld so beeinflussen kann, dass ein lokaler Zellschaden verursacht wird [McCreery et al., 1990]. Mit den Simulationen von McIntyre und Grill [McIntyre und Grill, 2001] sind erstmals Aussagen über Stromdichteverteilung einer Nadelelektrode möglich. Wie zu erwarten, ist die Stromdichte an der Spitze der Nadel und dem Übergang zwischen Elektrode und Isolationsschicht am höchsten. Dabei hängt die Stromdichteverteilung von der speziellen Elektrodengeometrie ab [Habel, 2004]. Die Verwendung einer Isolationsschicht kann die räumliche Veränderung der Stromdichte verringern und damit die Homogenität erhöhen. In Entfernungen von über 50 μm zur Elektrode können die Veränderungen des elektrischen Feldes durch veränderte Geometrien vernachlässigt werden. Der Einfluss auf die elektrische Anregbarkeit der Neuronen ist minimal. Für Neuronen, die sich ungefähr 50 μm von der Elektrode entfernt befinden, verhält sich das elektrische Feld von Nadelelektroden nahezu identisch zu dem einer Punktelektrode [McIntyre und Grill, 2001].

2.1.2. Ineinander greifende Elektroden / Fingerelektroden

Ineinander greifende oder auch Fingerelektroden sind in ihrer Anwendung sehr vielseitig und daher weit verbreitet. Dabei spielt das elektrostatische Feld zwischen den Elektroden für verschiedenen Anwendungen eine große Rolle. Die ineinander greifenden Elektroden werden als photosensitive Detektoren [Averin et al., 1996], als Filter für Oberflächenwellen (SAW) [Morgan, 1985] und als Feuchtigkeitssensoren [Bearzotti et al., 1996] verwendet. Bei biologischen Fragestellungen gewinnt dieser Elektrodentyp ebenfalls an Bedeutung. Mit Hilfe der Fingerstrukturen kann durch Impedanzmessungen das Anhaften von Zellen auf den Elektroden charakterisiert oder eine Zelldichte ermittelt werden [Chang et al., 2005]. Eine räumliche Trennung von lebenden und toten Bakterien der Art *Listeria* ist durch das Anlegen einer 1 V-Wechselspannung mit einer Frequenz von 50 kHz möglich [Li, 2002]. Diese Effekte, verursacht durch das Anlegen einer Wechselspannung an ineinander greifende Elektroden, werden in der Biotechnologie, speziell für die Charakterisierung und Trennung von Zellen mittels dielektrischer Spektroskopie, ausgenutzt [Asami, 2002]. Zum besseren Verständnis der Kräfte, die auf die Zellen wirken, tragen Berechnungen der Dielektrophorese [Pohl et al., 1978; Pething et al., 1992], der Elektrorotation [Holzapfel et al., 1982; Gimsa und Wachner, 1998] und der sich ausbreitenden Wellen der Dielektrophorese [Li, 2004] bei.

Der Vorteil dieser Sensoren bzw. Elektroden ist dabei die einfache und preiswerte Herstellung. Die Berechnungen des elektrischen Potentials und der Kapazität zwischen den einzelnen Elektroden waren bisher nur mit erheblichem Aufwand möglich [Engan, 1969]. Erst den Otter publizierte eine vereinfachte Möglichkeit, die charakteristischen Größen zu ermitteln [den Otter, 2002]. Die gemachten Annahmen führen zu vernachlässigbaren Abweichungen von der exakten Lösungen von Engan [Engan, 1969].

2.1.3. Phasengrenze Metall-Elektrolyt

Eine, die Stimulation von biologischen Zellen wesentlich bestimmende, Komponente ist die Phasengrenze zwischen den Metallelektroden und Elektrolyt. Der Elektrolyt, der das Überleben der Zellen gewährleistet, besteht aus in Wasser gelösten Ionen. Aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Dipolmomenten der Wassermoleküle und der Ionenladung bildet sich um die Ionen eine Solvathülle. Die damit verbundene eingeschränkte Beweglichkeit der Ionen führt also zu einer Erhöhung des Widerstandes des Elektrolyten.

Unter Gleichgewichtsbedingungen sind die Kräfte, die auf ein Ion wirken, isotrop. Daher

wird auch kein elektrisches Potential aufgebaut. An einer Phasengrenze, in diesem Fall am Metall-Elektrolyt, wird diese Symmetrie gebrochen. An der Grenzfläche zwischen Metall und Elektrolyt wirken auf die Ionen anisotrope Kräfte, die mit Abhängigkeit des Abstands zur Grenzfläche variieren. Dieses führt zu einer Ausrichtung der gelösten Ionen und der Dipole des Lösungsmittels und damit zu einem Überschuss von ionischer Ladung in der Nähe der Phasengrenze.

Die Ladungsakkumulation im Elektrolyten führt dazu, dass sich auf der Oberfläche der Metallelektrode ein gleichgroßes Potential mit entgegengesetztem Vorzeichen ausbildet. So entsteht eine Ladungstrennung an der Grenzfläche von Metall und Elektrolyt, die mit einem Potentialgradienten verbunden ist. Diese Grenzfläche kann daher als Kapazität betrachtet werden. Ein Ladungsausgleich ist nicht möglich, da es keine direkte Leitung zwischen der ionischen im Elektrolyten und der Elektronen-Leitung im Metall gibt. Im Ruhezustand ist das Potential betragsmäßig so klein, dass an den Metallelektroden keine elektrolytischen Prozesse einsetzen.

Die hier vorgestellten Modelle zur Beschreibung der Phasengrenze basieren auf einem ideal polarisierbaren Übergang von Metall und Elektrolyt. Das heißt, dass das Potential verändert werden kann, ohne dass ein Strom fließt [Rubinstein, 1995] und sich die Elektrode rein kapazitiv verhält.

Das Helmholtz-Modell (Abb. 2.1 a)) für die Doppelschicht besteht aus einem einfachen Plattenkondensator. Dabei wird davon ausgegangen, dass sich die Überschussladung der Elektrode an der Oberfläche befindet. Im Elektrolyten bildet sich dann eine starre Schicht aus solvatisierten Ionen parallel zur Metallelektrode aus. Diese Ebene, auch äußere Helmholtz-Ebene genannt, ist definiert durch den Ladungsschwerpunkt der Ionen. Die Flächenkapazität ist dann gegeben durch

$$C_H = \frac{\varepsilon \cdot \varepsilon_0}{d} \quad , \quad (2.1)$$

wobei ε die Dielektrizitätskonstante des Elektrolyten, ε_0 die Dielektrizitätskonstante von Vakuum ($8.85 \cdot 10^{-12} \text{ F} \cdot \text{m}^{-1}$) und d der kleinste Abstand der Ionen zur Metalloberfläche sind. Dabei wird der Abstand der solvatisierten Ionen gewöhnlicherweise mit 3 \AA angenommen [Rubinstein, 1995]. Die Kapazität, die durch das Ausbilden der starren Doppelschicht entsteht, liegt in einem Bereich von $5 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-1}$ bis $50 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-1}$ [Hamann und Vielstich, 1998]. Der große Vorteil dieses Modells ist seine Einfachheit. Eine oft beobachtete Abhängigkeit der Doppelschichtkapazität von der Elektrolytkonzentration bzw. -komposition und dem Potential kann mit diesem Modell nicht erklärt werden.

In dem Modell von Gouy und Chapman [Gouy, 1910; Chapman, 1913] wird angenommen, dass die elektrostatische Wechselwirkung von Metallelektrode und Ionen durch die ther-

mische Bewegung der Ionen und Moleküle beeinflusst wird. Es kommt deshalb zur Ausbildung einer diffusen Doppelschicht, in der sich die Ionen bewegen können (Abb. 2.1 b)). Dabei wird die Elektrode als ein "makroskopisches Ion" betrachtet, welches durch die diffuse Anordnung der solvatisierten Ionen abgeschirmt wird. Der Vorteil dieses Modells ist, dass es eine Abhängigkeit der Doppelschichtkapazität von dem Potential und der Elektrolytkonzentration gibt. Der Nachteil dieses Modells ist, dass es nur für sehr schwache Elektrolyten eine gute Übereinstimmung mit den gemessenen Werten liefert. In höher konzentrierten Elektrolyten ist die gemessene Kapazität größer als die nach Gleichung (2.17) berechnete. Die Dicke und die Kapazität der diffusen Doppelschicht hängen unmittelbar von der Konzentration des Elektrolyten ab und wachsen mit sinkender Konzentration. So beträgt beispielsweise die Ausdehnung der Doppelschicht für eine 0.1 molare Lösung ca. 10 Å [Fromherz, 2003].

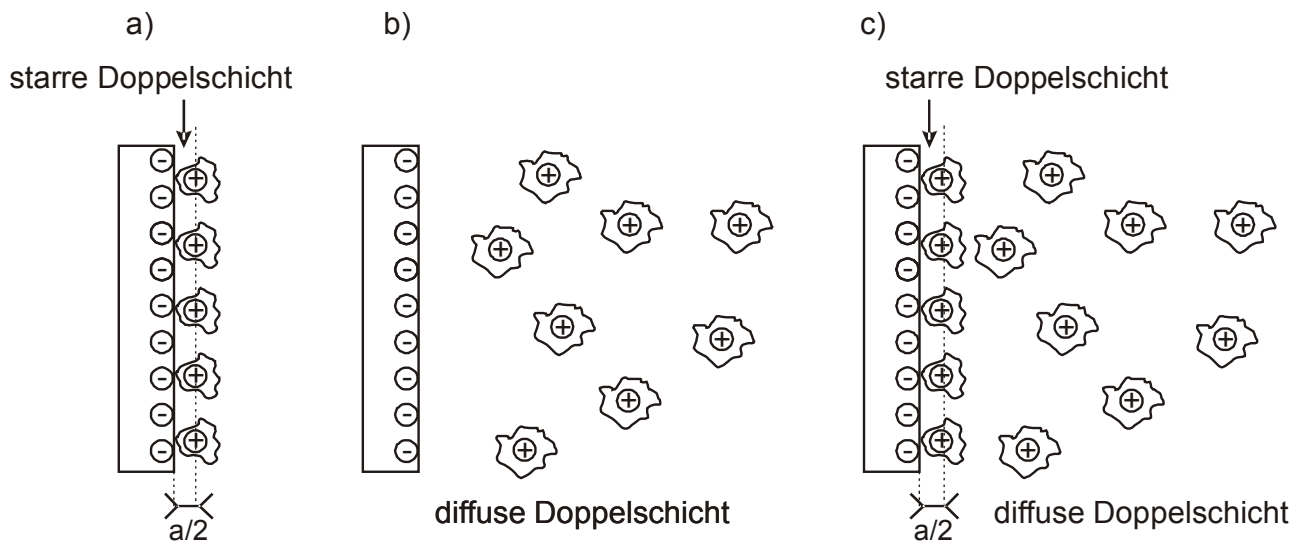


Abb. 2.1: Modelle verschiedener Doppelschichten

a) starre, elektrolytische Doppelschicht (nach Helmholtz)

b) diffuse Doppelschicht aus Überschussladungen (nach Gouy-Chapmann)

c) Kombination aus starrer und diffuser Doppelschicht (nach Stern)

Das Stern-Modell verbindet die beiden vorherigen Modelle miteinander (Abb. 2.1 c)). Es beinhaltet sowohl die Bildung einer starren und einer diffusen Doppelschicht. Die gemessene Doppelschicht-Kapazität verhält sich dann wie die Summe von zwei in Reihe geschalteten Kondensatoren (Gl. 2.18).

Obwohl das Stern-Modell in sehr vielen Fällen ausreichend ist, gibt es unter bestimmten Bedingungen Abweichungen von der gemessenen Doppelschicht-Kapazität. So verfeinerte Grahame [Grahame, 1947] das Modell von Stern wie folgt: Ionen, Lösungsmitteldipole oder neutrale Moleküle mit und ohne Dipolcharakter können an einer Metalloberfläche durch van-der-Waals-Kräfte oder Coulombsche Wechselwirkungen adsorbiert werden.

2. Grundlagen

Dabei wird die Adsorption in Abhängigkeit vom Potential der Elektrode entweder unterstützt oder geschwächt. So kann auch der Fall auftreten, dass Anionen auch bei einer negativen Aufladung der Elektrode adsorbiert werden. Durch die berücksichtigte Adsorption muss die starre Doppelschicht in Unterschichten unterteilt werden. Nach Grahame wird in diesem Fall eine innere und eine äußere Helmholtz-Schicht unterschieden. Die Ebene durch die Schwerpunkte der adsorbierten Ladungen wird als *innere Helmholtz-Ebene* bezeichnet [Jogl, 2005]. Bemerkenswert ist, dass innerhalb der Doppelschicht Feldstärken von bis zu $10^9 \text{ V} \cdot \text{m}^{-1}$ auftreten können [Schmickler und Henderson, 1996].

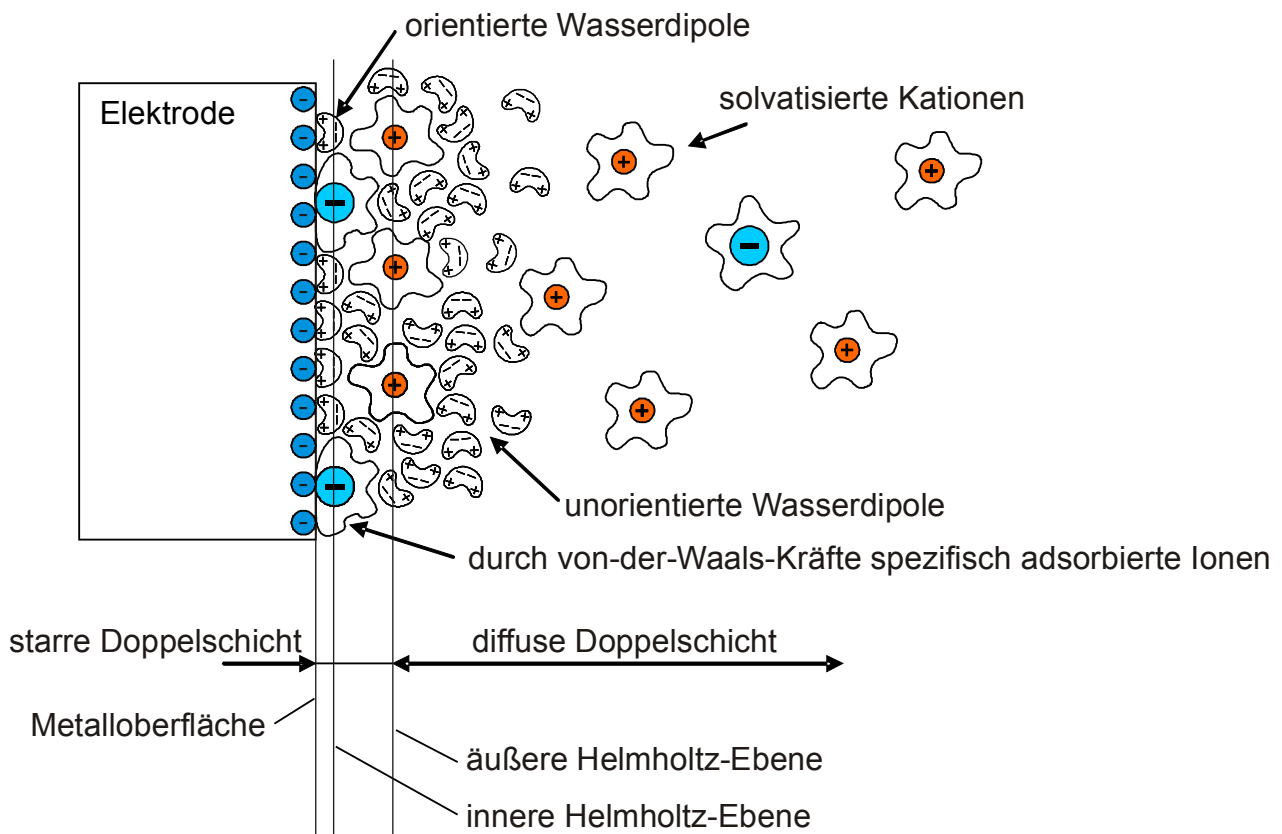


Abb. 2.2: Doppelschichtstruktur nach Grahame [Bard und Faulkner, 2001]

Weiterführende theoretische Abhandlungen über die Grenzfläche zwischen Elektrolyt und Elektrode finden sich in [Lipkowski und Ross, 1993].

2.1.4. Gouy-Chapman-Theorie

Ein sehr einfaches Modell für die Phasengrenze Metall-Elektrolyt wurde von Gouy [Gouy, 1910] und Chapman [Chapman, 1913] bereits Anfang des letzten Jahrhunderts entwickelt. Dabei werden in ihrem Modell folgende Annahmen getroffen:

- Ionen sind Punktladungen und -massen
- keine Fluktuationen in der Ionenverteilung
- Ionen wechselwirken nur mit dem Elektrodenpotential, jedoch nicht untereinander
- keine Adsorptions- oder Hydratationsvorgänge
- Lösungsmittel besitzt eine konstante Dielektrizität
- vollkommen ebene, unendlich ausgedehnte Oberfläche mit gleichmäßiger Ladungsverteilung

Die Verteilung der Ionen an der Phasengrenze kann nun mit Hilfe der Elektrostatik und der Statistischen Mechanik berechnet werden. Dafür wird folgendes angenommen: Die ebene Elektrode sei in Kontakt mit einer Lösung eines z - z Elektrolyten (d.h. Kationen der Ladungszahl z und Anionen der Ladungszahl $-z$).

Dabei wird das Koordinatensystem so gewählt, dass die Elektrode bei $x = 0$ liegt und senkrecht zur x -Achse steht. Weiterhin erfüllt das innere Potential $\phi(x)$ die Poisson-Gleichung.

$$\frac{d^2 \phi}{dx^2} = -\frac{\rho(x)}{\varepsilon \cdot \varepsilon_0} \quad (2.2)$$

wobei $\rho(x)$ die Ladungsdichte des Elektrolyten, ε die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels und ε_0 die des Vakuums sind. Die Dichten $n_+(x)$ und $n_-(x)$ sind die Dichten der Kationen und Anionen, die im Inneren der Lösung gleich n_0 sind.

$$\rho(x) = z \cdot e_0 [n_+(x) - n_-(x)] \quad (2.3)$$

Die Ionendichte muss vom Potential $\phi(x)$ abhängen. Wird ein Punkt im Lösungsinnen als Bezugspunkt gewählt, so ist $\phi(\infty) = 0$, und es kann die Boltzmann-Statistik wie folgt angewendet werden:

$$\begin{aligned} n_+(x) &= n_0 \cdot \exp\left(-\frac{z \cdot e_0 \cdot \phi(x)}{k_B \cdot T}\right) \\ n_-(x) &= n_0 \cdot \exp\left(\frac{z \cdot e_0 \cdot \phi(x)}{k_B \cdot T}\right) \end{aligned} \quad (2.4)$$

2. Grundlagen

Dabei entsprechen e_o der Elementarladung mit $e_o = 1.602 \cdot 10^{-19}$ C, k_B der Boltzmannkonstanten $k_B = 8.62 \cdot 10^{-5}$ eV·K⁻¹, $\phi(x)$ dem inneren Potential und z der Anzahl der Ladungen. Werden nun die Gl. (2.4) und Gl. (2.3) in Gl. (2.2) eingesetzt, so ergibt sich eine Differentialgleichung für $\phi(x)$, die als Poisson-Boltzmann-Gleichung bekannt ist.

$$\frac{d^2 \phi}{dx^2} = -\frac{z \cdot e_o \cdot n_o}{\varepsilon \cdot \varepsilon_o} \cdot \left[\exp\left(-\frac{z \cdot e_o \cdot \phi(x)}{k_B \cdot T}\right) - \exp\left(\frac{z \cdot e_o \cdot \phi(x)}{k_B \cdot T}\right) \right] \quad (2.5)$$

Zunächst wird der einfache Fall betrachtet, in dem überall $z \cdot e_o \cdot \phi(x) / k_B \cdot T \ll 1$ gilt. Dann kann der Exponent linearisiert werden, und es ergibt sich die linearisierte Poisson-Boltzmann-Gleichung

$$\frac{d^2 \phi}{dx^2} = \kappa^2 \cdot \phi(x) \quad \kappa = \left[\frac{2 \cdot (z \cdot e_o)^2 \cdot n_o}{\varepsilon \cdot \varepsilon_o \cdot k_B \cdot T} \right]^{1/2}, \quad (2.6)$$

wobei κ die inverse Debye-Länge ist. Die Lösung, die der Randbedingung $\phi(\infty) = 0$ genügt, hat die Form $\phi(x) = A \cdot \exp(-\kappa \cdot x)$, wobei die Konstante A durch das Ladungsgleichgewicht festgelegt wird.

$$\int_0^\infty \rho(x) dx = -\sigma \quad (2.7)$$

Dabei ist σ die Oberflächenladungsdichte des Metalls, welche durch die Raumladung in der Lösung kompensiert wird. Durch einige Zwischenberechnungen lässt sich die Konstante A bestimmen.

$$\begin{aligned} \rho(x) &= -\varepsilon \cdot \varepsilon_o \frac{d}{dx^2} [A \cdot \exp(\kappa \cdot x)] = -\varepsilon \cdot \varepsilon_o \cdot A \cdot \kappa^2 \cdot \exp(\kappa \cdot x) \\ \int_0^\infty \rho(x) dx &= -\varepsilon \cdot \varepsilon_o \cdot A \cdot \kappa^2 \int_0^\infty \exp(\kappa \cdot x) dx = -\varepsilon \cdot \varepsilon_o \cdot A \cdot \kappa^2 \left[-\frac{1}{\kappa} \cdot \exp(\kappa \cdot x) \right]_0^\infty \\ &= -\varepsilon \cdot \varepsilon_o \cdot A \cdot \kappa = -\sigma \\ A &= \frac{\sigma}{\varepsilon \cdot \varepsilon_o \cdot \kappa} \end{aligned}$$

$\rho(x)$ berechnet sich aus $\phi(x)$ und der Poisson-Gleichung. Es ergeben sich für das Potential somit

$$\phi(x) = \frac{\sigma}{\varepsilon \cdot \varepsilon_o \cdot \kappa} \cdot \exp(-\kappa \cdot x) \quad (2.8)$$

und für die Ladungsdichte entsprechend

$$\rho(x) = -\varepsilon \cdot \varepsilon_0 \frac{d^2 \phi}{dx^2} = \sigma \cdot \kappa \cdot \exp(-\kappa \cdot x) \quad . \quad (2.9)$$

Die Raumladung fällt also in der Lösung exponentiell ab, wobei die Debye-Länge die Ausdehnung festlegt. Dieser Ladungsverteilung entspricht eine Kapazität.

Das Elektrodenpotential ist gegeben durch Gl. (2.10)

$$\phi(x) = \phi(0) = \frac{\sigma}{\varepsilon \cdot \varepsilon_0 \cdot \kappa} \quad , \quad (2.10)$$

wobei Dipolpotentiale in diesem Modell nicht betrachtet werden. Die Kapazität der Phasengrenze pro Fläche ist bekannt als Doppelschichtkapazität und berechnet sich nach Gl. (2.11).

$$C = \frac{\sigma}{\phi(0)} = \varepsilon \cdot \varepsilon_0 \cdot \kappa \quad (2.11)$$

Die Doppelschichtkapazität ähnelt der Kapazität eines Plattenkondensators, bei dem der Plattenabstand durch die Debye-Länge charakterisiert wird. Dieser Abstand beträgt in sehr konzentrierten Elektrolyten nur wenige Ångström und entsprechend hoch sind dann die Kapazitäten.

Obwohl Gl. (2.9) und Gl. (2.10) die Berechnung des Potentials bzw. der Ladungsdichte ermöglichen, gelten sie nur sehr eingeschränkt für kleine Ladungsdichten an den Elektroden.

2.1.5. Ableitung der Gouy-Chapman-Kapazität

Für einen z-z Elektrolyten kann man über die lineare Näherung hinausgehen und die nichtlineare Poisson-Boltzmann-Gleichung (2.5) explizit lösen. Dazu wird die Gl. (2.5) in folgende Form umgewandelt.

$$\frac{d^2 \phi}{dx^2} = -\frac{2 z e_0 n_0}{\varepsilon \varepsilon_0} \sinh\left(\frac{z e_0 \phi(x)}{k_B T}\right) \quad (2.12)$$

Nach Multiplikation mit $2 d\phi(x)/dx$ und der Verwendung einer einfachen Relation können beide Seiten integriert werden.

$$\begin{aligned}
 \frac{d^2 \phi}{dx^2} &= -\frac{2ze_0 n_0}{\varepsilon \varepsilon_0} \sinh\left(\frac{ze_0 \phi(x)}{k_B T}\right) \quad \left| \cdot 2 \frac{d\phi}{dx} \right. \\
 2 \frac{d\phi}{dx} \frac{d^2 \phi}{dx^2} &= -\frac{4ze_0 n_0}{\varepsilon \varepsilon_0} \frac{d\phi}{dx} \sinh\left(\frac{ze_0 \phi(x)}{k_B T}\right) \quad \left| \int_0^\infty dx \quad \text{mit: } \frac{d}{dx} \left(\frac{d\phi}{dx} \right)^2 = 2 \frac{d^2 \phi}{dx^2} \frac{d\phi}{dx} \right. \\
 \left(\frac{d\phi}{dx} \right)^2 \Big|_0^\infty &= -4 \frac{ze_0 n_0}{\varepsilon \varepsilon_0} \int_0^\infty \sinh\left(\frac{ze_0 \phi(x)}{k_B T}\right) \frac{d\phi}{dx} dx
 \end{aligned} \tag{2.13}$$

Damit ergibt sich die Gl. (2.13).

Da sowohl das elektrische Feld E und das Potential ϕ im Unendlichen verschwinden, kann man beide berechnen. Für die Lösung des Integrals muss jedoch die Funktion innerhalb des sinh substituiert und die Ableitung von da/dx gebildet werden.

$$\begin{aligned}
 \int_0^\infty \sinh\left(\frac{ze_0 \phi(x)}{k_B T}\right) \frac{d\phi}{dx} dx &\rightarrow a(x) = \frac{ze_0 \phi(x)}{k_B T} \\
 \frac{da}{dx} &= \frac{ze_0}{k_B T} \frac{d\phi(x)}{dx} \rightarrow dx = \frac{k_B T}{ze_0} \frac{d\phi}{da} da \\
 \int_0^\infty \sinh\left(\frac{ze_0 \phi(x)}{k_B T}\right) \frac{d\phi}{dx} dx &= \int_0^\infty \sinh(a) \frac{d\phi}{dx} \frac{k_B T}{ze_0} \frac{dx}{d\phi} da \\
 &= \frac{k_B T}{ze_0} \int_0^\infty \sinh(a) da = \frac{k_B T}{ze_0} [\cosh(a)]_0^\infty
 \end{aligned}$$

Für das elektrische Feld ergibt sich also

$$\begin{aligned}
 \left(\frac{d\phi}{dx} \right)^2 \Big|_0^\infty &= E(0)^2 = -\frac{4ze_0 n_0}{\varepsilon \varepsilon_0} \frac{k_B T}{ze_0} \cosh\left(\frac{ze_0 \phi(x)}{k_B T}\right) \Big|_0^\infty \\
 &= -\frac{4e_0 n_0 k_B T}{\varepsilon \varepsilon_0} \left[1 - \cosh\left(\frac{ze_0 \phi(0)}{k_B T}\right) \right] \\
 E(0)^2 &= \frac{4e_0 n_0 k_B T}{\varepsilon \varepsilon_0} \left[\cosh\left(\frac{ze_0 \phi(0)}{k_B T}\right) - 1 \right].
 \end{aligned} \tag{2.14}$$

Die Oberflächenladungsdichte σ und die Feldstärke E sind gemäß $E(0) = \sigma/\varepsilon\varepsilon_0$ voneinander abhängig. Durch das Verwenden der Winkelidentität $\cosh(x)-1=2\cdot\sinh^2(x/2)$ ergibt sich für die Oberflächenladungsdichte

$$\sigma = (8kTn_o \varepsilon \varepsilon_o)^{1/2} \sinh^2 \left(\frac{ze_o \phi(o)}{2k_B T} \right). \quad (2.15)$$

Wird nun noch nach dem Potential differenziert, da $C = \delta \sigma / \delta \phi$, so ergibt sich schließlich die differentielle Kapazität

$$C_{GC} = \varepsilon \varepsilon_o \kappa \cosh \left(\frac{ze_o \phi(o)}{2k_B T} \right). \quad (2.16)$$

Da das Potential $\phi(o)$ nicht gemessen werden kann, muss Gl. (2.16) umgeformt werden. Das Elektrodenpotential ϕ unterscheidet sich von $\phi(o)$ nur durch eine Konstante. Wenn $\phi(o)=0$ ist, so trägt die Elektrode keine Ladung. Das entsprechende Elektrodenpotential ϕ_{pzc} ist das Potential am Ladungsnullpunkt (pzc = potential of zero charge). Mit dieser Annahme kann Gl. (2.16) in die Gouy-Chapman-Kapazität umgeformt werden.

$$C_{GC} = \varepsilon \varepsilon_o \kappa \cosh \left(\frac{ze_o \phi - \phi_{pzc}}{2k_B T} \right) \quad (2.17)$$

Bei geringen Elektrolytkonzentrationen bis zu $10^{-3}M$ stimmt die Gouy-Chapman-Theorie gut mit den experimentellen Werten für die Doppelschichtkapazität überein, wenn die spezifische Adsorption vernachlässigt wird. Bei höheren Elektrolytkonzentrationen gibt es jedoch systematische Abweichungen. Die experimentellen Werte folgen dann der Gleichung (2.18),

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_{GC}} + \frac{1}{C_H} \quad (2.18)$$

wobei C_{GC} der Gouy-Chapmann-Kapazität aus Gl. (2.16) und C_H der Helmholtz-Kapazität entsprechen und C_H unabhängig von der Konzentration n_o des Elektrolyten ist (Stern-Modell).

Experimentell kann die Helmholtz-Kapazität bestimmt werden, indem man die flächenbezogene Kapazität C der Phasengrenze bei verschiedenen Konzentrationen misst und anschließend $1/C$ gegen die berechnete inverse Gouy-Chapmann-Kapazität $1/C_{GC}$ bei konstanter Oberflächenladungsdichte aufträgt. Es entsteht eine Gerade, deren Schnittpunkt mit der Ordinate die gesuchte Größe $1/C_H$ repräsentiert [Schmickler und Henderson, 1996]. Wenn die Oberfläche der Elektrode unbekannt ist, so wird die nicht flächenbezogene Kapazität aufgetragen und man erhält die Fläche aus dem Anstieg der Geraden. Sollte bei dem Auftragen der experimentellen Werte keine Gerade entstehen, so liegt eine spezifische Adsorption vor.

2.2. Pulseinkopplung in neuronale Netzwerke

Bei Stimulationsexperimenten werden elektrische Strom- oder Spannungspulse in neuronale Netzwerke eingekoppelt. Die Art der gewählten Stimulation hängt dabei von der Elektrodengeometrie, den zu untersuchenden Zellen und dem speziellen Experiment ab. Bei der Stimulation mit Multi-Elektroden-Arrays (MEAs) werden meist stromkonstante Pulse verwendet [Buitenweg et al., 2002; Jimbo und Kawana, 1992], um die zeitliche Veränderung der Elektrodenimpedanz zu kompensieren. Im Gegensatz dazu stehen Experimente von Wagenaar et al., die mit Spannungspulsen eine größere Stimulationseffizienz als mit Strompulsen gleicher Maximalspannung erreichten [Wagenaar et al., 2004]. Da durch die Impedanz des Gesamtsystems, bestehend aus Elektrode, Elektrolyt und Neuron, der angelegte Puls verändert wird, ist die Kenntnis der Übertragungsfunktion und der herrschenden Potentialverhältnisse für Stimulationsvorgänge notwendig.

Die Übertragungsfunktion modelliert die Spannung, die tatsächlich über der Zellmembran in Abhängigkeit von den an den Elektroden angelegten Pulsen, abfällt. Für eine solche Simulation ist eine genaue Kenntnis der elektrischen Eigenschaften des Systems Elektrode-Elektrolyt-Neuron zwingend erforderlich. Daher liegen zahlreiche Modelle vor, die die Einkopplung elektrischer Signale über Elektroden in Nervenzellen beschreiben. Die wichtigsten Ansätze zur Pulseinkopplung an MEAs werden in dem folgenden Kapitel 2.2.1. vorgestellt.

2.2.1. Spezielle Modelle

Bei den etablierten Stimulationselektroden wird mittels eines Ersatzschaltbildes der Einkopplungsprozess in die Nervenzellen beschrieben. Die Wahl und Anordnung der Einzelkomponenten (Elektrode, Elektrolyt, Neuron) ergeben ein Modell, welches idealerweise die gleichen elektrischen Eigenschaften wie das Gesamtsystem aufweisen soll. Ein Vergleich von gemessener und berechneter Impedanz fordert eine Neuanpassung des Ersatzschaltbildes oder lässt Rückschlüsse auf Eigenschaften des Gesamtsystems zu. Ein sehr einfaches Beispiel eines Ersatzschaltbildes ist in Abb. 2.3 dargestellt [Rutten et al., 2001]). Die entscheidenden Größen in Abb. 2.3 sind die Impedanz Z_{el} der Elektrode, der Widerstand R_{seal} , der ein Maß für die Güte der Verbindung von Neuron und Elektrode ist, und die Kapazität C_{sh} zwischen den Zuleitungen und dem Elektrolyten. Die Impedanz der Elektrode wird mit $Z_{el} = K/(i\omega)$ beschrieben, wobei K einen freien Parameter darstellt. Es wird also von einer rein kapazitiven Einkopplung über die Elektroden ausgegangen.

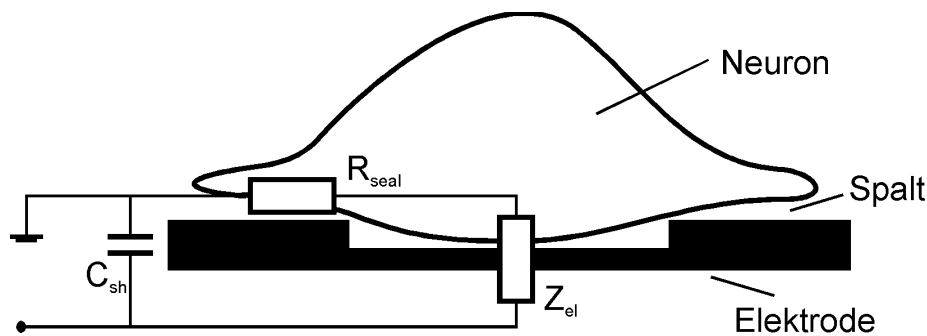


Abb. 2.3: Ersatzschaltbild der Schnittstelle von Elektrode und Neuron
(nach [Rutten et al., 2001])

Ein wesentlicher Parameter für die Qualität der Verbindung von Neuron und Elektrode ist der Dichtungswiderstand R_{seal} . Dabei indiziert ein hoher Widerstand eine sehr gute Kontaktqualität von Neuron und Elektrode, die selektive Stimulation und Ableitung von Zellen zulässt. Experimentelle Ergebnisse zeigen, dass eine hohe Qualität der Verbindung von Neuron und Elektrode mit einem hohen Bedeckungsgrad der Elektrode korreliert [Regehr et al., 1989, Breckenridge et al., 1995; Bove et al., 1995]. Im Falle eines kleinen Widerstandes ist das detektierbare Zellsignal wesentlich kleiner, da ein Teil des Stromes über den Elektrolyten abfließt [Rutten et al., 2001].

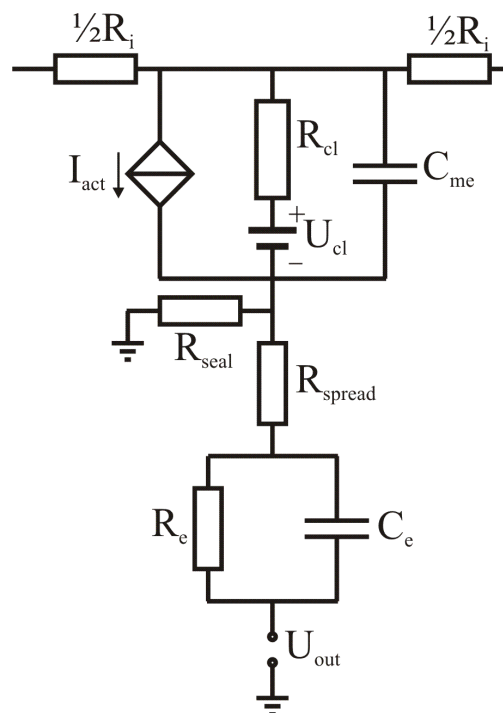


Abb. 2.4: Ersatzschaltbild zur Beschreibung des Elektroden-Neuronen-Interfaces (nach [Bove et al., 1995])

Ein deutlich komplexeres Schaltbild beschreiben Bove et al. [Bove et al., 1995], der die Zellmembran und ihre Ionenkanälen unter Verwendung des Hodgkin und Huxley Modells

2. Grundlagen

[Gerstner und Kistler, 2002] berücksichtigt. In dem Modell (vgl. Abb. 2.4) werden die Elektrodenimpedanz mit den Parametern R_e und C_e , die Ionenströme von Natrium und Calcium durch I_{act} , das Gleichgewichtspotential mit U_{Cl} und der Membranwiderstand der Chlor-Ionen durch U_{Cl} beschrieben. Die Parameter R_{seal} und R_{spread} bilden den Dichtungs- bzw. Elektrolytwiderstand und R_i stellt den Widerstand zu den angrenzenden Zellbereichen dar. Die Kapazität zwischen Elektrolyt und Zellinnerem wird durch C_{me} beschrieben, der sich aus der Membrankapazität, der Kapazität der inneren und äußeren Helmholtzbenen sowie der Kapazität der diffusen Doppelschicht zusammensetzt. Es muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass in diesem Modell die elektrochemische Doppelschicht, die sich über den Elektroden ausbildet, nicht berücksichtigt wird.

Das in Abb. 2.4 genannte Hodgkin-Huxley-Modell ist in Abb. 2.5 ausführlich erklärt. Die semipermeable Zellmembran trennt das Zellinnere vom Extrazellulärraum (Elektrolyten) und stellt eine Kapazität dar. Der an die Elektrode angelegte Strom lädt zum einen die Zellmembran-Kapazität auf und fließt zum anderen durch die Ionenkanäle der Membran in das Zellinnere. Nach der Ladungserhaltung gilt in einem kleinen Gebiet der Membran, dass der angelegte Strom $I(t)$ sich in einen kapazitiven Anteil I_{cap} , der die Kapazität in Abb. 2.5 auflädt, und weitere Komponenten I_k , die durch die Ionenkanäle fließen, aufteilt.

$$I(t) = I_{cap}(t) + \sum_k I_k(t) \quad (2.19)$$

Im Standard-Hodgkin-Huxley-Modell werden drei Ionenkanal-Typen berücksichtigt; der Natrium-Kanal (Index Na), der Kalium-Kanal (Index K) und ein Verlustkanal mit dem Widerstand R (siehe Abb. 2.5).

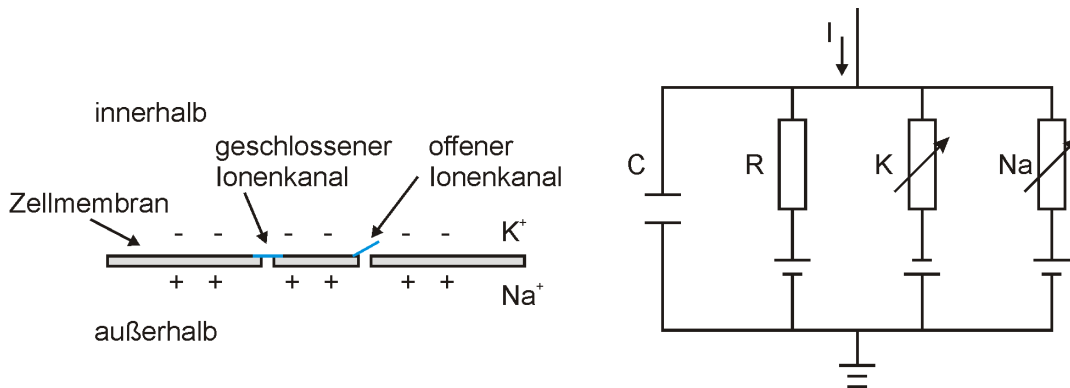


Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Hodgkin-Huxley-Modells. Beschreibung der passiven elektrischen Eigenschaften der Zellmembran durch die Kapazität C und den Widerstand R . Darstellung der nichtlinearen Eigenschaften durch die spannungsunabhängigen Ionenkanäle von Natrium (Na) und Kalium (K) [Gerstner und Kistler, 2002].

Nach der Definition der Kapazität $C=Q/U$, mit der Ladung Q und der Spannung U , kann der Strom, der die Kapazität der Zellmembran auflädt, als $I_{cap} = C \cdot dU/dt$ ausgedrückt werden. Somit ergibt sich für den Strom Gl. (2.20).

$$C \frac{dU}{dt} = - \sum_k I_k(t) + I(t) \quad (2.20)$$

Die drei im Hodgkin-Huxley-Modell beschriebenen Ionenkanäle werden durch ihren Widerstand oder ihre Leitfähigkeit charakterisiert. Der Verlustkanal wird durch eine spannungsunabhängige Leitfähigkeit $g_L = 1/R$ beschrieben. Die Leitfähigkeiten der beiden anderen Kanäle sind sowohl zeit- als auch spannungsabhängig. Falls alle Kanäle geöffnet sind, können die Ströme bei der höchsten Leitfähigkeit g_{Na} bzw. g_K fließen. Gewöhnlich sind immer einige von den Ionenkanälen blockiert. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Kanal geöffnet ist, wird durch die zusätzlichen Variablen m , n und h beschrieben. Die Kombination von m und h kontrolliert das Öffnen und Schließen der Na^+ -Kanäle und die Variable n analog für die K^+ -Kanäle. Nun lassen sich die drei Anteile des Stromes wie folgt formulieren:

$$\sum_k I_k = g_{Na} \cdot m^3 \cdot h \cdot (U - E_{Na}) + g_K \cdot n^4 \cdot (U - E_K) + g_L \cdot (U - E_L) \quad (2.21)$$

wobei die Parameter E_{Na} , E_K und E_L den reversiblen Potentialen der zugehörigen Ionenkanäle entsprechen [Gerstner und Kistler, 2002].

Die Gleichungen von Hodgkin und Huxley beschreiben sehr allgemein die elektrophysiologischen Eigenschaften von Axonen, die zu einem Aktionspotential führen: einem kurzen Einfluss von Na^+ -Ionen und dem folgenden Ausfluss von Ka^+ -Ionen. In höher entwickelten neuronalen Netzwerken finden aufgrund der höheren Anzahl von Ionenkanälen komplexere Vorgänge statt. Um diese Mechanismen korrekt zu beschreiben, muss das Hodgkin-Huxley-Modell durch Ionenkanäle von z.B. Chlor und Calcium und um die Spannungsabhängigkeit einzelner Kanäle erweitert werden.

Fromherz beschreibt den Elektroden-Neuronen-Kontakt mit Hilfe des Ersatzschaltbildes eines planaren Kern-Mantel-Leiters [Fromherz, 2003]. Der Elektrolyt im Spalt zwischen Neuron und Elektrode bildet dabei den leitfähigen Kern und die Isolationsschicht der Elektrode und die Zellmembran werden als Mantel angenommen. Dieses Modell erlaubt die Annahme des Kontaktes zwischen Neuron und Elektrode als flächig oder als punktförmig. Ein flächiger Kontakt ist dadurch gekennzeichnet, dass der Strom eines jeden Flächenelementes des Interfaces durch ein Ersatzschaltbild wie in Abb. 2.6 a) charakterisiert wird. Der Strom im Spalt zwischen Zelle und Elektrode ergibt sich aus dem Verschiebungs- und Ionenstrom durch die Zellmembran und dem Verschiebungsstrom durch die Isolationsschicht auf der Elektrode, die durch eine flächenspezifische Kapazität ausgezeichnet ist. Die Zellmembran wird dabei sowohl durch eine flächenspezifische Kapazität als auch durch einen flächenspezifischen Widerstand gebildet. Der laterale Spaltwiderstand kann aus der Spalthöhe und der spezifischen Leitfähigkeit des Elektroly-

2. Grundlagen

ten berechnet werden. Mit dem Ersatzschaltbild in Abb. 2.6 lassen sich sowohl ein Spannungsprofil für den Spalt zwischen Elektrolyt und Neuron als auch die Spannung, die über der Zellmembran abfällt, bestimmen. Ein Nachteil dieses Modells ist, dass keine aktiven Komponenten zur Beschreibung der Zellmembran, wie im erweiterten Hodgkin-Huxley-Modell, eingehen. Daher können Stimulations- und Ableitprozesse mit dem Modell eines flächigen Kontaktes nicht hinreichend beschrieben werden.

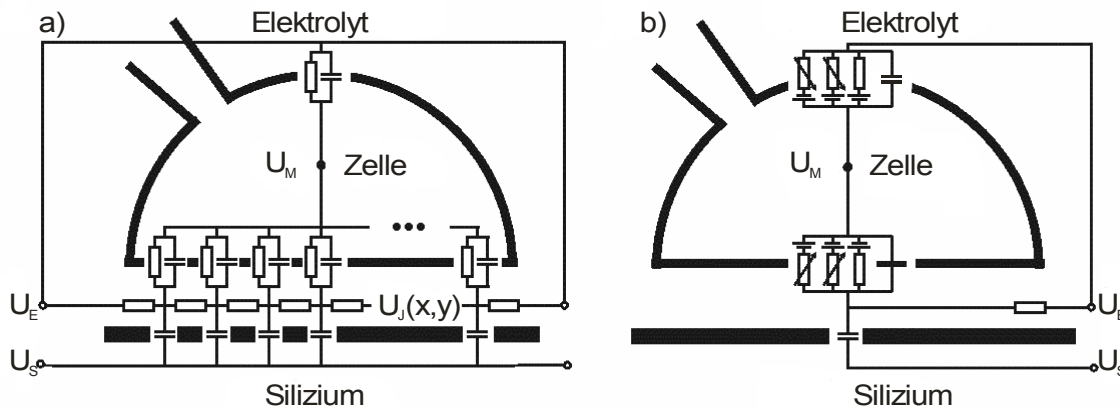


Abb. 2.6: Ersatzschaltbild für das Kern-Mantel-Modell

a) flächiger Kontakt, b) punktförmiger Kontakt [Fromherz, 2003]

Der Kontakt zwischen einem Neuron und der Elektrode soll nun als punktförmig angenommen werden. In diesem Fall wird die Isolationsschicht durch eine globale Kapazität beschrieben. Die Zellmembran weist nun ein elektrophysiologisches Verhalten nach Hodgkin und Huxley auf. Der im Spalt vorhandene Elektrolyt wird durch einen globalen Widerstand charakterisiert, der identisch dem Dichtungswiderstand ist [Rutten et al., 2001; Bove et al., 1995]. Durch die Berücksichtigung des Hodgkin-Huxley-Modells bei einem punktförmigen Kontakt von Neuron und Elektrode ist es möglich, die Anregungsprozesse und das Antwortverhalten der Neuronen zu beschreiben. Zusätzlich kann das Potential bestimmt werden, das über der Zellmembran anliegt.

Das Problem bei der Detektion von neuraler, elektrischer Aktivität ist das hohe Maß der Variabilität der Signale. Daher ist es für das Verständnis der Informationsverarbeitung in neuronalen Netzwerken unerlässlich, dass die bestehenden Modelle immer weiter angepasst bzw. neue Techniken zur Bestimmung der Zellsignale entwickelt werden. Daher wird abschließend noch ein Modell beschrieben, welches von Martinoia [Martinoia et. al., 2004] entwickelt wurde, um der biologischen Varianz der elektrischen Signale gerecht zu werden. Im Fokus dieser Arbeit steht die Verbindung von Zellmembran und Mikroelektrode, die durch ein Ersatzschaltbild modelliert wird (FEM-Berechnung mit Hilfe der Software HSPICE [Massobrio und Antognetti, 1993]). Im Detail besteht das hier entwickelte Modell aus vier Bestandteilen: dem Makromodell des Neurons, der synaptischen Interaktion, dem

Makromodell der Metallmikroelektrode sowie der Verbindung von Elektrode und Neuron.

Das Makromodell des Neurons basiert auf den Annahmen von Hodgkin und Huxley und erfasst die dynamischen Eigenschaften der Na^+ -, K^+ - und anderer Ionenkanäle. In Anlehnung an Gl. (2.19) ergibt sich für den Strom I durch die Membran Gl. (2.22), wobei V_{mem} dem Membranpotential, C_{mem} der Membrankapazität und I_L dem Leckstrom entsprechen.

$$I = C_{\text{mem}} \frac{dV_{\text{mem}}}{dt} + I_{\text{Na}} + I_{\text{K}} + I_L \quad (2.22)$$

Die Betrachtung der Einzelströme wie in Gl. 2.21 führt zu „anormalen Impedanzen“, wie von Mauro [Mauro, 1961] beobachtet wurde. Um diesen Effekt zu beseitigen, formulierte Chua [Chua, 1980] die Annahme, dass die Aktivierungsparameter für die Kalium-Kanäle und die Aktivierungs- und Inaktivierungsparameter der Natrium-Kanäle proportional zu der Spannungsvariablen einer linearen Kapazität sind. Nun können die Gleichungen für den Natrium- bzw. Kalium-Strom in algebraische Gleichungen [Storace et al., 1997] umgeformt werden. Die zeitlich veränderliche Leitfähigkeit der Ionenströme wird ersetzt und durch Ersatzschaltbilder (vgl. [Martinoia et. al., 2004] Fig. 1) mit einer ähnlicher Struktur wie die Hodgkin-Huxley-Gleichungen modelliert.

Die synaptischen Interaktionen zwischen den Neuronen des Netzwerkes werden durch die Kinetik des Bindens der Neurotransmitter an postsynaptische Rezeptoren simuliert. Dabei werden die synaptischen Aktionen ebenfalls mit Gleichungen der Struktur von Hodgkin und Huxley modelliert [Destexhe et al., 1994]. Die präsynaptischen Ersatzschaltbilder erzeugen dabei einen Rechteckpuls von charakteristischer Dauer und Amplitude, welcher im realen Netzwerk die ausgestoßene Transmittermenge nach einem präsynaptischen Aktionspotential repräsentiert.

Das Makromodell der Metallelektrode besteht ausschließlich aus passiven Bauelementen in der Konfiguration von Abb. 2.7. Dabei entspricht der metallische Widerstand R_{met} dem Widerstand der Leiterbahn der Mikroelektrode. Die Kapazität des Interfaces von Elektrode und Elektrolyt wird durch den Parameter C_e dargestellt. Der Widerstand R_e repräsentiert

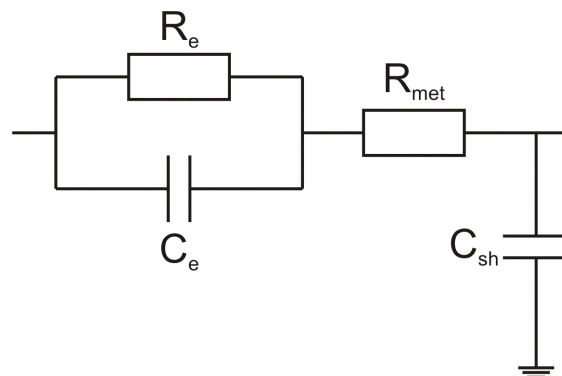


Abb. 2.7: Modell der Metall-Mikroelektrode [Martinoia et. al., 2004]

2. Grundlagen

die Menge der Ladungsträger, die die Doppelschicht passieren und fasst alle Streukapazitäten zusammen. Die Verbindung von Elektrode und Neuron stellt in dem Modell von Martinoia den entscheidenden Teil dar und kann experimentell durch Isolationsschichten oder den Bedeckungsgrad der Elektrode beeinflusst werden. Der Dichtungswiderstand R_{seal} zwischen Zelle und Elektrode gibt an, wie gut das Neuron mit der Mikroelektrode verbunden ist.

$$R_{\text{seal}} = \frac{\rho_s}{d} \cdot \delta \quad (2.23)$$

Dabei ist ρ_s der spezifische Widerstand des Elektrolyten ($\rho_s = 0.7 \Omega \cdot \text{m}^{-1}$ für normale Kochsalzlösung), d der mittlere Abstand von Neuron und Elektrode und δ der Oberflächenüberlappungskoeffizient ($\delta = \text{Oberfläche Neuron} / \text{Oberfläche Mikroelektrode}$). Der Verlustwiderstand R_{spread} charakterisiert den Signalverlust der Zelle aufgrund des signifikanten Abstandes von Elektrode und Neuron und berechnet sich nach Gl. (2.24) [Newman, 1966].

$$R_{\text{spread}} = \frac{\rho_s \sqrt{\pi}}{4 \sqrt{S_{\text{microel}}}} \quad (2.24)$$

Die Variable S_{microel} entspricht dabei der Oberfläche der Mikroelektrode. Schließlich wird für die Elektroden-Neuronen-Verbindung noch die Kapazität C_{hd} zwischen der Zellmembran und der Elektrolytlösung benötigt. Sie modelliert die Polarisationschichten des Elektrolyten, die sich direkt vor dem Neuron und der Mikroelektrode ausbilden. Unter Berücksichtigung der Doppelschicht-Theorie [Yates et al., 1974] und dem Stern-Modell ergibt sich die Kapazität C_{hd} aus der Reihenschaltung von C_{h} und C_{d} . Dabei repräsentieren C_{h} die Kapazität der Helmholtz-Schicht und C_{d} die Gouy-Chapman-Kapazität (Kapazität der diffusen Doppelschicht). Die Berechnung der beiden Kapazitäten erfolgt nach den Gln. (2.25) und (2.26),

$$C_{\text{h}} = \frac{(\varepsilon_{\text{IHP}} \cdot \varepsilon_0) \cdot (\varepsilon_{\text{OHP}} \cdot \varepsilon_0)}{(\varepsilon_{\text{OHP}} \cdot \varepsilon_0) \cdot d_{\text{IHP}} + (\varepsilon_{\text{IHP}} \cdot \varepsilon_0) \cdot d_{\text{OHP}}} \cdot S_{\text{cont}} \quad (2.25)$$

$$C_{\text{d}} = \frac{\sqrt{2 \cdot \varepsilon_{\text{d}} \cdot \varepsilon_0 \cdot k_{\text{B}} \cdot T \cdot C_{\text{b}}}}{\frac{k_{\text{B}} T}{e_0}} \cdot S_{\text{cont}} \quad (2.26)$$

wobei ε_{IHP} und ε_{OHP} die Dielektrizitätskonstanten der inneren und äußeren Helmholtz-Ebenen sind. ε_0 entspricht der Dielektrizitätskonstanten im Vakuum, d_{IHP} repräsentiert

den unhydratisierten Abstand von Ionen und Neuron bzw. d_{OHP} den hydratisierten Abstand von Ionen und Neuronen. Der Parameter ε_d entspricht der Dielektrizitätskonstanten der diffusen Doppelschicht. Die Größe S_{cont} berechnet sich nach $S_{\text{cont}} = S_{\text{microel}} \cdot \delta$ und ist gleich der Kontaktfläche von Neuron und Elektrode. Letztlich stehen k_B für die Boltzmann-Konstante, T für die absolute Temperatur, e_o für die Elementarladung und C_b für die Grundkonzentration des Elektrolyten.

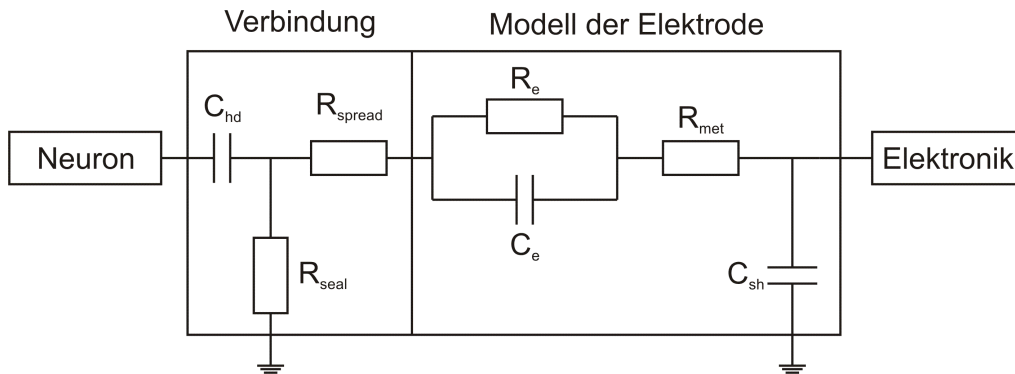


Abb. 2.8: Ersatzschaltbild der Schnittstelle Elektrode/ Neuron und der Elektrode [Martinoia et. al., 2004]

In den Simulationen sind R_{seal} , R_{spread} und C_{hd} die Parameter, die berechnet werden. In den Berechnungen zeigt sich, dass der Dichtungswiderstand R_{seal} und die Kapazität C_{hd} den größten Einfluss auf die berechnete Signalschärfe bzw. Form des extrazellulären Signals haben.

Für die Simulation eines Aktionspotentials von Nervenzellen auf Mikroelektroden sind bestimmte Annahmen notwendig. Unter der Bedingung $\omega R_e C_e = 1$ ergeben sich für eine Frequenz von $f = 1 \text{ kHz}$ (nach Vereinbarung in der Literatur [Robinson, 1968]) die Parameter $C_e = 1.14 \text{ nF}$ und $R_e = 0.14 \text{ M}\Omega$ unter Beachtung der experimentell bestimmten Impedanz mit $Z = 100 \text{ k}\Omega$. Ein weiterer experimentell bestimmter Wert ist der Elektroden-durchmesser von $30 \text{ }\mu\text{m}$ mit einer Fläche von $707 \text{ }\mu\text{m}^2$. Der Bahnwiderstand und die Streukapazität werden mit $R_{\text{met}} = 1.5 \text{ }\Omega$ bzw. $C_{\text{sh}} = 5 \text{ pF}$ bestimmt. Der Teil des Neurons, der mit der Elektrode in Kontakt ist, wird mit einem Bedeckungsgrad von $\delta = 0.5$ angenommen.

Mit diesen Parametern wird die elektrische Aktivität simuliert und mit den experimentell bestimmten Werten von 21 Tage alten Neuronenkulturen verglichen. Eine sehr gute Übereinstimmung mit der detektierten Aktivität lässt sich nur unter der Verwendung von $R_{\text{spread}} = 11.7 \text{ k}\Omega$, $C_{\text{hd}} = 17.45 \text{ pF}$ und $R_{\text{seal}} = 5 \text{ M}\Omega$ erzielen. Dabei entspricht der Dichtungswiderstand von $R_{\text{seal}} = 5 \text{ M}\Omega$ einem mittleren Zell-Elektroden-Abstand von 70 nm , welcher auch von anderen Forschungsgruppen bestimmt wurde [Vassanelli und Fromherz, 1999].

Das in Abb. 2.9 gemessene biphasige Signal eines Neurons konnte erst mit der gewünschten Übereinstimmung berechnet werden, als die Ionenkanaldichte im Bereich der Kontaktfläche von Neuron und Elektrode um 40% reduziert wurde. Dabei bezieht sich die

2. Grundlagen

Verringerung der Ionenkanäle auf den Mittelwert über der gesamten Zellmembran, die keinen Kontakt mit der Metallelektrode hat. Zellphysiologisch bedeutet es, dass die Ionenkanäle in Gebiete ohne Elektrodenkontakt migrieren. Wird die Ionenkanaldichte im Bereich der Überlappung nicht verändert, so ist das Ergebnis ein stärker monophasiges Signal, welches nicht dem tatsächlich aufgenommenen entspricht. Die Verringerung der Kanalanzahl führt somit zu einer stärkeren kapazitiven Einkopplung des elektrischen Signals in das Neuron.

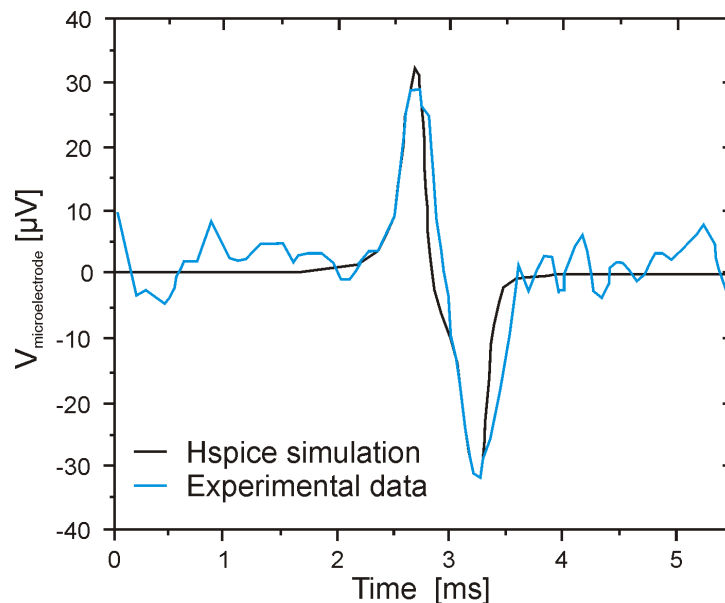


Abb. 2.9: Vergleich der gemessenen und simulierten Aktivität eines Neurons [Martinoia et. al., 2004]

Die Parameter R_{seal} und C_{hd} haben nur einen geringen Einfluss auf die Signalform, hängen dabei aber stark von dem Spalt zwischen Neuron und Elektrode ab. Einen großen Einfluss haben diese beiden Parameter auf die detektierbare Signalhöhe. Wird z.B. der Dichtungswiderstand von $5 \text{ M}\Omega$ auf $20 \text{ M}\Omega$ erhöht, dann vergrößert sich das zu messende Zellsignal von $75 \text{ }\mu\text{V}$ auf $200 \text{ }\mu\text{V}$.

Alle in diesem Kapitel aufgeführten Ersatzschaltbilder wurden unter der Randbedingung aufgestellt, dass die Elektroden einen Durchmesser aufweisen, der höchstens so groß wie die Neuronen sind ($d_{\text{Neuron}} \approx 10\text{-}30 \text{ }\mu\text{m}$). Außerdem besitzen alle hier betrachteten Elektroden eine Isolationsschicht.

Da die neuentwickelten Fingerstrukturen (vgl. Kap. 3) sehr viel größer als der Neuronendurchmesser sind, wird ein eigenes Ersatzschaltbild entwickelt, um die Einkopplung der elektrischen Pulse zu beschreiben. Die nicht-isolierten Metallelektroden finden daher in den Untersuchungen besondere Beachtung.

Abschließend werden einige Parameter, die in den Simulationen betrachtet wurden, auf ihren Einfluss im Experiment untersucht. Dabei bilden die Arbeiten von Paik et al. die Grundlage für diese Untersuchungen [Paik et al., 2003]. Es hat sich gezeigt, dass eine hohe Selektivität der Zellsignale erreicht wird, wenn die Elektrodenfläche möglichst klein ist. Mit einer kleinen Elektrodenfläche ist eine Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses verbunden. Gleichzeitig wird aber die Impedanz erhöht, was zu einer Verringerung des Ladungstransfers führt. Daher schlagen Paik et al. vor, dass die Elektroden minimiert werden bei gleichzeitiger Vergrößerung der "effektiven" Oberfläche. Dies wird durch das Abscheiden einer sehr rauen polykristallinen Silizium-Schicht auf einem Siliziumwafer realisiert. Auf dieser Oberfläche wird nun die eigentliche Goldelektrode auf einer Haftschrift abgeschieden. Als Isolationsschicht dient eine 300 nm dünne SiN-Schicht. Durch die Abscheidung der Elektroden auf dem polykristallinen Silizium wird die Oberfläche im Gegensatz zu herkömmlichen Elektroden stark vergrößert (vgl. Abb. 2.10). Die veränderten Oberflächen spiegeln sich dann in den Werten der experimentell bestimmten Impedanzen wider. So wurde für die glatte Elektrodenoberfläche ein Wert von $Z = 1.03 \text{ M}\Omega$ bzw. für die Impedanz der rauen Elektrode mit $Z = 2.451 \text{ k}\Omega$ bestimmt. Die für die Detektion von Aktionspotentialen unbedingt notwendig kleine Elektrodenimpedanz ist also relativ einfach durch die Verwendung einer polykristallinen Siliziumschicht zu erreichen.

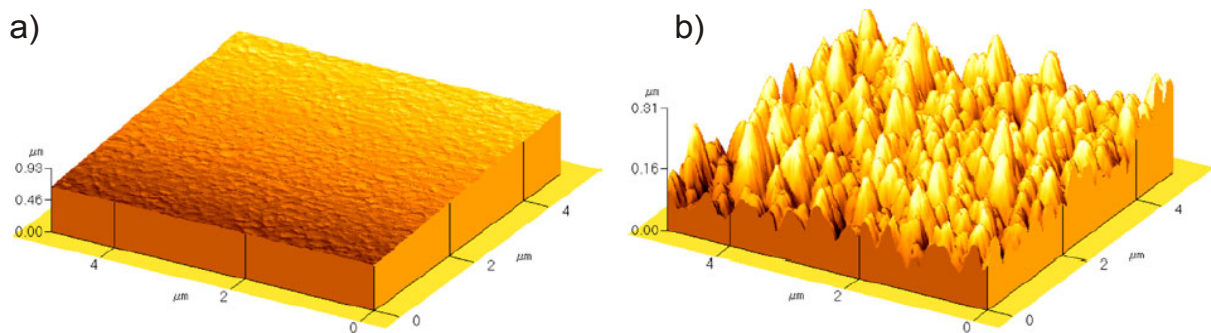


Abb. 2.10: AFM-Aufnahmen der Elektrodenoberfläche ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$)

- a) Glatte Oberfläche der Goldelektrode auf einer SiN-Schicht mit einer rms-Rauhigkeit von 4.57 nm
- b) Rauhe Oberfläche der Goldelektrode auf Polysilizium mit einer rms-Rauhigkeit von 37.3 nm (entnommen aus [Paik et al., 2003])

2.2.2. Dynamische Einflüsse der angelegten elektrischen Felder auf Zellen und Elektrolyt

Bei Anlegen eines elektrischen Pulses an ein biologisches System treten verschiedene dynamische Effekte auf, die an dieser Stelle vorgestellt werden. Es wird dabei geprüft, inwiefern die auftretenden Einflüsse für das untersuchte Stimulationsinterface, speziell die vorgenommenen Impedanzmessungen, relevant sind.

Temperaturanstieg im Stimulationsgebiet bzw. der Elektrolytlösung

Durch das Anlegen einer Spannung an Elektrolyte kann durch die Umwandlung von elektrischer in thermische Energie eine Erwärmung der Lösung auftreten. Mit einem Temperaturanstieg der Elektrolytlösung ist gleichzeitig ein höherer Leitwert verbunden. Da eine Erwärmung von 1 K den Leitwert um 3% erhöht [Hamann und Vielstich, 1998], kann sich dieser Effekt als störend in Impedanzmessungen erweisen. Kontrollmessungen mit einer Infrarot-Kamera an einer 0.1 M KH_2PO_4 -Lösung (Kulturmedium für Hefezellen) ergaben jedoch, dass bei einer 30-minütigen Stimulation mit biphasigen 10 V-Pulsen sich die Temperatur nur um 0.3 K erwärmte. Daher kann dieser Effekt bei allen weiteren Betrachtungen vernachlässigt werden.

Dielektrophorese

Die dielektrophoretische Kraft wurde erstmal von Pohl [Pohl und Crane, 1971] beobachtet. Er zeigte, dass durch das Anlegen von ungleichen AC-Feldern an einen Elektrolyten eine Bewegung der polarisierbaren Partikel induziert wird und nannte die auftretende Kraft dielektrophoretische Kraft.

Die Grundlage dieser Kraft ist also ein inhomogenes elektrisches Feld, welches sich auch an asymmetrischen oder auch an planaren Elektrodenarrays ausbildet. Das elektrische Feld erzeugt in der Zelle ein Dipolmoment, welches dann mit dem inhomogenen Feld wechselwirkt. Die auftretenden Kräfte können von der Zelle aufgrund der Inhomogenität nicht kompensiert werden. Für kugelförmige Zellen kann die resultierende Kraft berechnet werden [Prasad et al., 2004]

$$F = 2 \pi r^3 \epsilon_m \text{Re}(f_{\text{CM}}) \nabla E^2 \quad (2.27)$$

In Gl. (2.27) sind r der Zellradius, ϵ_m die Dielektrizitätskonstante des Mediums, E der Effektivwert des elektrischen Feldes und $\text{Re}(f_{\text{CM}})$ der Realteil des Clausius-Mosotti-Faktors (effektive Polarisierbarkeit der Zelle). Dieser ist in Gl. (2.28) definiert,

2.2.2. Dynamische Einflüsse der angelegten elektrischen Felder auf Zellen und Elektrolyt

$$f_{\text{CM}} = \frac{(\varepsilon_z^* - \varepsilon_m^*)}{(\varepsilon_z^* + 2\varepsilon_m^*)} \quad (2.28)$$

in der ε_z^* und ε_m^* die komplexe Permittivität von Zelle und Medium darstellen und $\varepsilon_z^* = \varepsilon - i\sigma/\omega$ gilt. Durch den Clausius-Mosotti-Faktor hängt die dielektrophoretische Kraft F von der angelegten Frequenz und der Leitfähigkeit des Mediums ab. Weiterhin ist die Kraft die auf eine Zelle wirkt umso größer, je geringer die Elektrodenfläche wird. Ursache hierfür sind die inhomogenen Felder, die durch die Kanteneffekte verstärkt werden.

Die dielektrophoretische Kraft wird ganz gezielt genutzt, um Neuronen gezielt bestimmte Orte auf der Elektrode zuzuweisen. Zusätzlich können verschiedene Zell- oder Bakterientypen aufgrund verschiedener intrazellulärer Potentiale voneinander getrennt werden [Pohl, 1978]. Dabei wird jeweils nur der Ort der entsprechenden Zelle verändert, aber nicht in die Zellaktivität beeinflusst [Prasad et al., 2004; Rutten et al., 2001].

Das Auftreten dielektrophoretischer Kräfte bei Impedanzmessungen an den Fingerstrukturen kann vernachlässigt werden, da sich über den ausgedehnten Elektroden ein über große Bereiche homogenes elektrisches Feld [Günther, 2004] ausbildet. Desweiteren sind für eine Bewegung von Partikeln oder Zellen mit einem Durchmesser von 1-10 μm Feldstärken von 10^4 - $10^5 \text{ V}\cdot\text{m}^{-1}$ erforderlich [Ramos et al., 1998], die aber mit einer Messspannung von 100 mV für die Impedanzmessungen nicht erreicht werden. Bei der Stimulation der Neuronen mit 2.2 V werden nach FEM-Berechnung Feldstärken von ca. $4 \text{ kV}\cdot\text{m}^{-1}$ erzielt. Es konnte aber bei keinem Experiment ein Anzeichen für das Wirken von dielektrophoretischen Kräften, z.B. durch Ortsveränderung, festgestellt werden. Dies liegt zum einen an den recht homogenen Feldern und zum anderen daran, dass die Neuronen fest auf dem Glassubstrat bzw. der Elektrode haften und nicht frei beweglich sind. Einzig bei der Stimulation von suspensierten Hefezellen mit 10 V-Pulsen kann eine Beeinflussung durch dielektrophoretische Kräfte nicht ausgeschlossen werden.

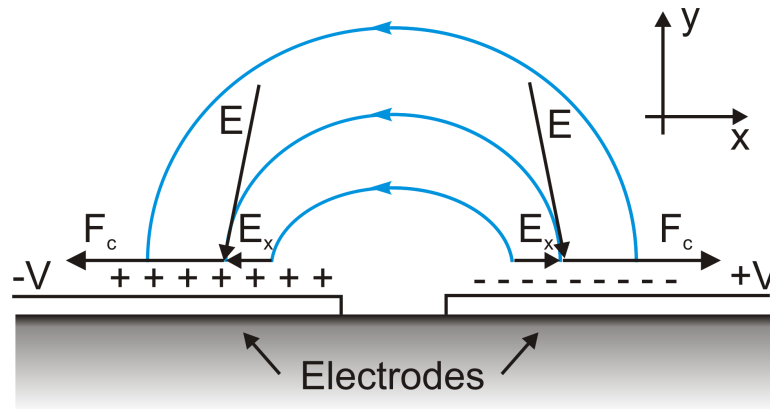


Abb. 2.11: Schema zur Entstehung der AC-Elektroosmose und der resultierenden Kraft F_c auf die Doppelschicht [Green et al., 2002]

AC-Elektroosmose

Durch das Anlegen einer Wechselspannung an koplanare Elektroden werden inhomogene Felder erzeugt, die einen Ionenfluss in der Elektrolytlösung hervorrufen. Die Ursache dafür ist, dass eine Komponente E_x des angelegten Feldes tangential zur diffusen Doppelschicht der Elektroden ausgerichtet ist [Green et al., 2002]. In einem anderen Experiment wird das elektrische Feld senkrecht zur Elektrodenoberfläche angelegt [Yeh et al., 1997]. Daher ist auch hier mit der räumlichen Modulation der elektrochemischen Doppelschicht ein lateraler Fluss verbunden. Da die Ladungsträger der Doppelschicht mit dem elektrischen Feld wechselwirken, ergibt sich eine resultierende Kraft F_c , die von dem Spalt zwischen den Elektroden in Richtung der Elektrodenoberfläche zeigt (siehe Abb. 2.11). Durch viskose Reibung in der Flüssigkeit überträgt sich diese Bewegung auf den restlichen Elektrolyten und resultiert in einer Rollbewegung [Ramos et al., 1999a; Ramos et al., 1999b; Green et al., 2000].

Die Elektrorotation sei nur kurz als möglicher Effekt erwähnt, der ausschließlich bei einer Quadrupol-Anordnung von Elektroden auftritt und zu einer Rotationsbewegung von biologischen Zellen führt [Asami 2002].

2.3. Biologische Grundlagen

In diesem Teil der Arbeit werden biologische Begriffe und Mechanismen erläutert, die zum Verständnis der in den Experimenten untersuchten Mechanismen notwendig sind. Dabei werden insbesondere die elektrische Aktivität der Neuronen und die Stoffwechselvorgänge der Hefezellen betrachtet.

2.3.1. Aufbau von Neuronen

Ein typisches Neuron besteht aus vier morphologisch definierten Bereichen: dem Zellkörper (Soma), den Dendriten, dem Axon und den präsynaptischen Verbindungen. Das Soma ist umgeben von der Zellmembran, ca. 2 nm bis 8 nm dünn [Kartalopoulos, 1995] und enthält neben dem Zellkern u.a. Mitochondrien, die für die Funktionalität des Neurons notwendig sind. In dem Zellkörper (Soma) findet die Verarbeitung der Eingangssignale statt, die unter gewissen Randbedingungen weitergeleitet werden. Die Dendriten sind dünne, röhrenförmige und meist stark verästelte Fortsätze der Zellen, die für das Detek-

tieren von ankommenden Signalen anderer Nervenzellen verantwortlich sind. Im Gegensatz dazu steht das Axon, welches sich in weit vom Soma entfernten Gebiete ausbreitet. Das Axon hat die Hauptaufgabe, Ausgangssignale zu anderen Neuronen weiterzuleiten. Dabei kann ein Axon über eine Länge von 0.1 mm bis zu 3 m ein elektrisches Signal, das Aktionspotential, übertragen. Das Aktionspotential ist ein schneller, transients Nervenimpuls mit einer Amplitude von 100 mV und einer Dauer von ca. 1 ms [Kandel et al., 2000]. Diese elektrischen Signale finden ihren Ursprung in dem Axonhügel und werden dann das Axon entlang weitergeleitet. Das Ende des Axons teilt sich in feine Verästelungen und bildet Synapsen zu anderen Neuronen. Dabei wird die Zelle, welche das Signal weiterleitet, als präsynaptisch und die Empfängerzelle als postsynaptisch bezeichnet.

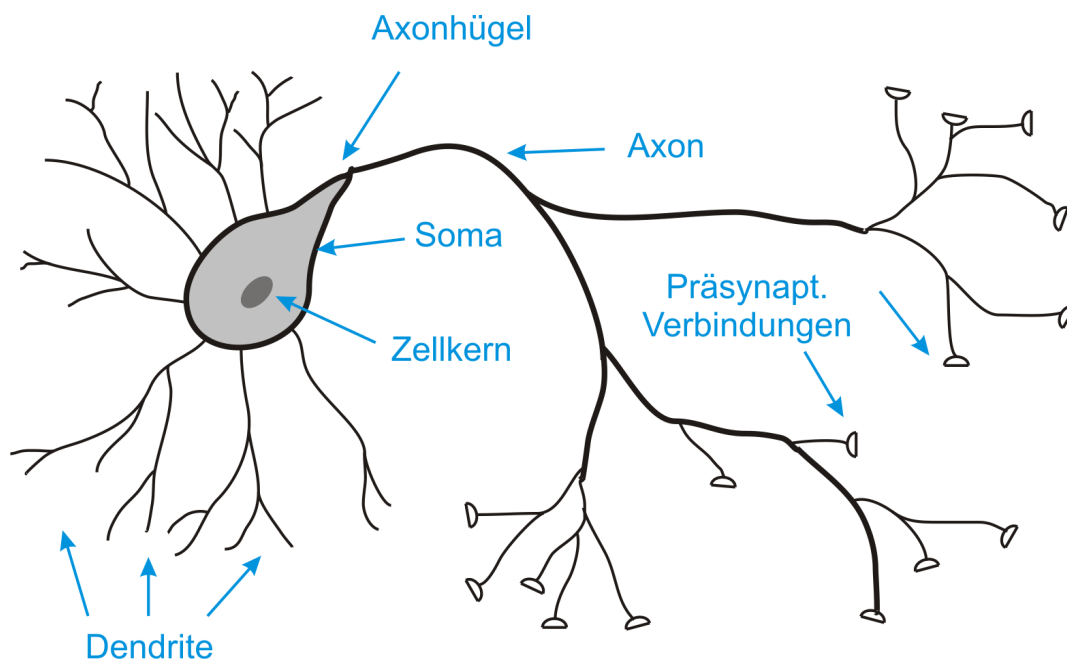


Abb. 2.12: Schematischer Aufbau eines Neurons

2.3.2. Entstehung eines Aktionspotentials

Jedes Neuron weist eine Ansammlung von positiven Ionen außerhalb und eine negative Ladungsakkumulation innerhalb der Membran auf. Unter physiologischen Bedingungen sind die Neuronen meist von einem kochsalz-ähnlichen Elektrolyten, bestehend aus Na^+ - und Cl^- -Ionen, umgeben. Der Innenraum der Zelle ist hauptsächlich mit K^+ -Ionen und organischen Anionen gefüllt (vgl. Tab. 2.1). Im elektrochemischen Gleichgewicht sind einige Ionenkanäle durchlässig für K^+ -, aber undurchlässig für Na^+ -Ionen. Durch den

2. Grundlagen

osmotischen Druck getrieben diffundieren K^+ -Ionen aus dem Zellkörper in den Elektrolyten. Die Na^+ -Ionen können dagegen nicht durch die semipermeable Zellmembran diffundieren. Durch den Transport von positiven Ladungsträgern aus der Zelle wird ein elektrisches Feld aufgebaut, und es stellt sich ein Gleichgewicht ein [Birbaumer und Schmidt, 1996; Hille, 2001]. Somit ist dann der Innenraum der Zelle negativer geladen als der die Zelle umgebende Elektrolyt. Die Potentialdifferenz zwischen Intra- und Extrazellulärraum ist als Membranpotential definiert und weist im Ruhezustand typischerweise Werte zwischen $-90 \text{ mV} \leq V_{MR} \leq -60 \text{ mV}$ auf. Diese Werte entsprechen etwa dem Nernst-Potential von K^+ -Ionen. Dabei beschreibt das Nernst-Potential die Gleichgewichtsspannung $V_{MR}(j)$ an einer für Ionen j permeablen Membran.

$$V_{MR} = \frac{RT}{z_j F} \cdot \ln \left(\frac{c_{Za}(j)}{c_{Zi}(j)} \right) \quad (2.29)$$

Dabei sind c_{Za} und c_{Zi} die Konzentration innerhalb (i) bzw. außerhalb (a) der Membran, z_k die Wertigkeit der Ionen, R die Gaskonstante, F die Faraday-Konstante und T die Temperatur. Das Ruhepotential ist also im wesentlichen ein Kalium-Gleichgewichtspotential. Bei einer ausschließlichen Permeabilität der Natrium-Ionen wäre das Ruhepotential positiv.

Tab. 2.1: Nernst-Potentiale für verschiedene Ionentypen j , mit den Ionenkonzentrationen c_{Za} und c_{Zi} von Säugetier-Skelettmuskelzellen [Hille, 2001]

j	$c_{Za}(j)$ [mM]	$c_{Zi}(j)$ [mM]	$V_{MR}(j)$ [mV]
Na^+	145	12	+67
K^+	4	155	-98
Ca^{2+}	1.5	0.0001	+129
Cl^-	123	4.2	-90

Von biologischem Interesse sind neben den K^+ - und Na^+ - auch noch die Ca^{2+} - und Cl^- -Kanäle, welche jeweils nur für eine spezifische Ionenart i gut durchlässig sind. Die Leitfähigkeit g_i ist dabei von dem Membranpotential V_M , der Konzentration verschiedener Moleküle c_L und der Zeit t abhängig.

$$g_{Mi} = g_{Mi}(i, V_M, C_L, t) \quad (2.30)$$

Die Leitfähigkeit spannungsgesteuerter Ionenkanäle ist abhängig vom Membranpotential der Zelle. Überschreitet das Membranpotential einen bestimmten Schwellwert, so wird die Leitfähigkeit durch die Ionenkanäle weiter erhöht, und es wird ein Aktionspotential ausgelöst.

Im Gleichgewichtszustand ($V_M = -70 \text{ mV}$) ist die Leitfähigkeit der spannungsgesteuerten Na^+ - und K^+ -Kanäle klein. Wird nun das Ruhepotential, z.B. durch einen externen Stimulus, verringert, so erhöht sich die Leitfähigkeit der Na^+ -Kanäle. Durch den folgenden Einstrom von positiven Na^+ -Ionen in die Zelle wird der Potentialunterschied innerhalb und außerhalb der Membran geringer ($V_{MR} \leq V_M \leq 0 \text{ mV}$, Depolarisation). Wird bei der Depolarisation ein Schwellwert erreicht, wird die Na^+ -Leitfähigkeit so weit erhöht, dass ein positiver Rückkopplungseffekt eintritt. Durch den erhöhten Na^+ -Einstrom wird das Zellinnere weiter positiv geladen, welches die Na^+ -Leitfähigkeit noch weiter erhöht. Das hat zur Folge, dass noch mehr Na^+ -Ionen einströmen. Dabei kann das Membranpotential sogar positiv werden. Durch die Änderung des Membranpotentials zu positiveren Werten wird mit einiger zeitlicher Verzögerung die Leitfähigkeit der K^+ -Kanäle ebenfalls erhöht, und positive geladene K^+ -Ionen strömen aus der Zelle. Durch das Ausfließen der positiven Ladung aus der Zelle wird das Membranpotential wieder negativ ($V_M < 0 \text{ mV}$, Repolarisation) und die Na^+ -Kanäle schließen. Durch die zeitliche Verzögerung der K^+ -Kanäle strömt meist soviel positive Ladung aus, dass ein negativeres Membranpotential als das Ruhepotential erreicht wird ($V_M < V_{RM}$, Hyperpolarisation) bevor die spannungsgesteuerten K^+ -Kanäle wieder schließen. Nun wird das Membranpotential durch spannungsunabhängige K^+ -Kanäle wieder auf das Ruhepotential eingestellt [Birbaumer und Schmidt, 1996]. Über eine energie-verbrauchende Pumpe wird langfristig gewährleistet, dass im Gleichgewichts-

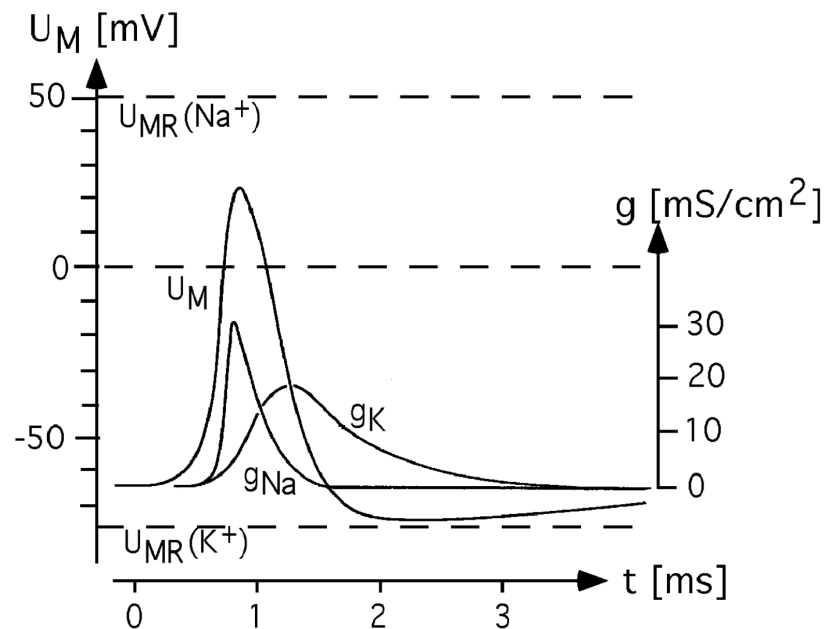


Abb. 2.13: Zeitlicher Verlauf eines Aktionspotentials, gemessen an einem Tintenfisch-Riesen-Axon bei 18.5°C . Aufgetragen sind der Verlauf des Membranpotentials U_M ($U_M = V_M$) und die Leitfähigkeit der potential-gesteuerten Na^+ - und K^+ -Kanäle. Aufgrund etwas unterschiedlicher Ionen-Konzentrationen im Vergleich zu Säugetier-Skelettmuskel-Zellen, weichen die hier eingetragenen Nernst-Potentiale von den in Tab. 2.1 dargestellten ab (entnommen aus [Birbaumer und Schmidt, 1996])

zustand die Na^+ - und K^+ -Gleichgewichtskonzentrationen in der Zelle aufrechterhalten werden [Birbaumer und Schmidt, 1996]. Diese Na^+ - K^+ -Pumpe ist aber nicht direkt mit dem Prozess der Aktionspotentialentstehung verbunden.

Der Stromfluss durch die einzelnen Ionenkanäle wird für das Beispiel eines Tintenfisch-Neurons beschrieben, da hier nur drei Typen von Kanälen berücksichtigt werden müssen. Dazu gehören potential-abhängige Natrium-Kanäle i , potential-abhängige Kalium-Kanäle j und potential-unabhängige Leck-Kanäle l . Die Leck-Kanäle bestehen dabei im wesentlichen aus den potential-unabhängigen K^+ -Kanälen, die das Ruhepotential der Zelle einstellen. Die Ionenkanäle werden durch ihre Leitfähigkeiten (g_{Na} , g_{K} , g_{L}) und ihr Gleichgewichtspotential ($V_{\text{MR}}(\text{Na}) > 0 \text{ mV}$, $V_{\text{MR}}(\text{K}) < 0 \text{ mV}$, $V_{\text{MR}} < 0 \text{ mV}$) beschrieben. Der Membranwiderstand der Zelle im Gleichgewichtszustand entspricht dann dem Kehrwert der Summe der Leitfähigkeiten der potential-unabhängigen Leck-Kanäle ($R_{\text{M}} = (\sum_l g_{\text{L}})^{-1}$). Für den Gesamtstrom I_{M} muss zusätzlich noch die Aufladung der Membran bei zeitlich veränderlichen Potentialen beachtet werden.

$$\begin{aligned} I_{\text{M}} &= \sum_i I_{\text{Mi}} + C_{\text{M}} \frac{dU_{\text{M}}}{dt} \\ &= \sum_i g_{\text{Na}} \cdot (U_{\text{M}} - U_{\text{MR}}(\text{Na})) + \sum_j g_{\text{K}} \cdot (U_{\text{M}} - U_{\text{MR}}(\text{K})) + \sum_l g_{\text{L}} \cdot (U_{\text{M}} - U_{\text{MR}}) + C_{\text{M}} \frac{dU_{\text{M}}}{dt} \quad (2.31) \end{aligned}$$

Grundsätzlich sind auch in den Nervenzellen von Säugetieren diese drei Kanal-Typen vorhanden. Jedoch sind beispielsweise in der Membran mehrere Natrium-Kanäle vorhanden, die sich durch ihre Aktionspotentialschwelle und Dynamik unterscheiden. Mit dem schon vorgestellten Modell von Hodgkin-Huxley lassen sich diese Kanäle beschreiben.

Durch spezielle Wirkstoffe können einige Ionenkanäle gezielt blockiert werden, so dass keine Ionen mehr durch sie transportiert werden. Als Beispiel sei hier Tetrodotoxin (TTX) für das gezielte Blockieren der potential-abhängigen Na^+ -Kanäle genannt.

Die Aktionspotentiale können sich innerhalb der Neuronen ausbreiten. An dem Ort x_1 wird durch einen Stimulus die Zellmembran über den Schwellwert für ein Aktionspotential depolarisiert. An der Stelle x_1 strömen lokal Na^+ -Ionen durch die Membran ins Innere der Zelle. Durch die lokale elektrostatische Abstoßung und durch Diffusion verteilen sich die Na^+ -Ionen innerhalb der Zelle. Dadurch kann an einem angrenzenden Ort x_2 die Zellmembran depolarisiert und ein Aktionspotential generiert werden. Durch das Einstromen und Verteilen der Na^+ -Ionen wird die Membran an der Stelle x_3 depolarisiert. Durch diesen sich wiederholenden Na^+ -Ionen-Einstrom senkrecht zur Membran kann sich ein Aktionspotential parallel zur Membran ausbreiten (vgl. Abb. 2.14).

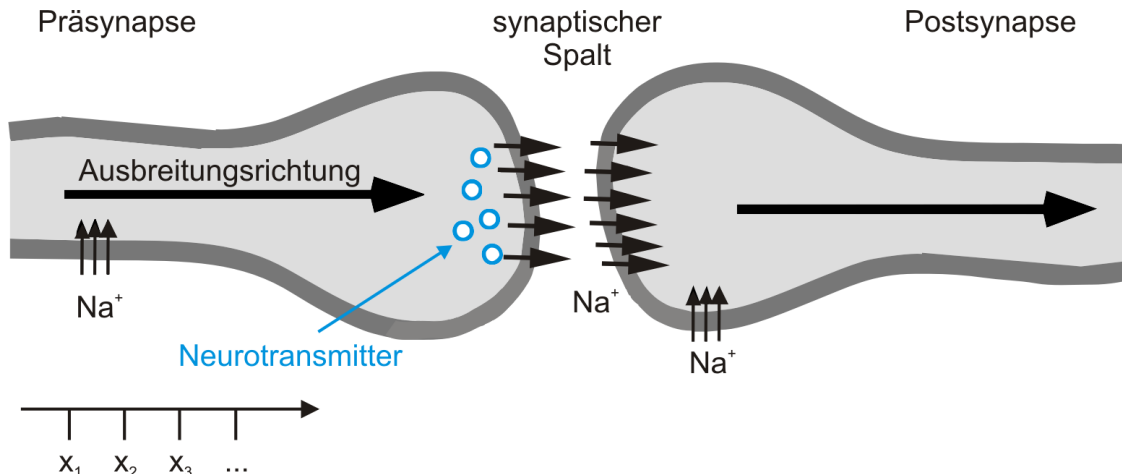


Abb. 2.14: Aktionspotential-Ausbreitung innerhalb einer Nervenzelle und Informationsfluss an einer erregenden Synapse zwischen zwei Nervenzellen [Parak, 1999]

Aufgrund der zeitabhängigen Leitfähigkeit der Ionenkanäle (vgl. Gl. (2.30)) muss beachtet werden, dass die Na^+ -Kanäle nach jedem Aktionspotential für eine bestimmte Zeit inaktiv sind. Innerhalb dieser Zeit – auch Refraktärzeit genannt – kann an dieser Stelle der Zellmembran kein Aktionspotential ausgelöst werden. Auf diesem Mechanismus basiert auch die Annahme, dass Aktionspotentiale nicht rückwärts laufen können [Birbaumer und Schmidt, 1996; Hille, 2001].

Die Verbindung der Neuronen und der Austausch von Information ist für alle Lebewesen von grundlegender Bedeutung. Der Austausch von Informationen zwischen zwei Nervenzellen findet über die Synapsen statt. So werden über diese Postsynapsen, die sich hauptsächlich an den Dendriten und dem Soma befinden, Signale von anderen Zellen wahrgenommen und verarbeitet. Die Weiterleitung erfolgt dann aus dem Axonhügel, dem Axon entlang bis zu den präsynaptischen Verbindungen zu den benachbarten Neuronen. Bemerkenswert ist, dass nicht die Höhe der Aktionspotentiale die Information überträgt, die im Mittel etwa konstant sind, sondern die Ereignishäufigkeit. Entlang der Zellfortsätze wird das Aktionspotential zu den Schnittstellen mit anderen Zellen geleitet. An den Synapsen werden die Aktionspotentiale elektrisch oder chemisch übertragen. Bei der chemischen Synapse wird bei Ankommen eines Aktionspotentials von der Präsynapse ein Botenstoff, der Neurotransmitter, in den synaptischen Spalt abgegeben. Der synaptische Spalt ist der Zwischenraum zwischen den beiden Synapsen und beträgt bei chemischen Synapsen zwischen 20 nm und 40 nm [Kandel et al., 2000]. Dieser ausgeschüttete Neurotransmitter bindet an Rezeptoren ligand-gesteuerter Kanäle in der postsynaptischen Membran und bewirkt dort einen Ionenstrom. Aufgrund der differenzierten Aufgaben der Nervenzellen im Organismus werden verschiedene Neurotransmitter freigesetzt. An erregenden Synapsen werden Botenstoffe ausgeschüttet, die bei Bindung an Rezeptoren der postsynaptischen Zelle die Kanäle depolarisieren (Na^+ -Kanäle). Durch die Depolarisation

kann dann ein Aktionspotential in dem postsynaptischen Neuron ausgelöst werden und sich dort ausbreiten. An hemmenden Synapsen werden Neurotransmitter in den synaptischen Spalt abgegeben, die bei Bindung an die Rezeptoren Ionenkanäle öffnen (z.B. Cl⁻-Kanäle). Dies führt zu einer Hyperpolarisation der postsynaptischen Zelle und verhindert somit die Bildung eines Aktionspotentials.

Diese beiden Typen von erregenden bzw. hemmenden Synapsen sind verantwortlich für die Informationsverarbeitung in neuronalen Netzwerken. Die Ausbildung eines Aktionspotentials hängt davon ab, ob die Eingangssignale der erregenden oder hemmenden Synapsen dominieren. Sind die erregenden Synapsen vorherrschend, wird die Zelle depolarisiert und ein Aktionspotential wird über das Axon weitergeleitet, welches wieder als Eingangssignal für andere Zellen wirkt. Im Organismus von Säugetieren werden die von Rezeptorzellen, wie z.B. Hör- oder Sehzellen, empfangenen Signale über erregende Synapsen an das Gehirn weitergeleitet. Dort findet eine Verarbeitung der Signale statt und eine Weiterleitung, beispielsweise an Muskelzellen, die eine Aktion durchführen, erfolgt. Dadurch, dass die Verknüpfung einzelner Neuronen nicht statisch ist, kann durch Lerneffekte die Stärke von Synapsen beeinflusst werden.

2.3.3. System der Hefezellen

Die elektrische Charakterisierung des Interfaces und seine Einkoppeleigenschaften soll möglichst detailliert erfolgen. Aus diesem Grund wird das Elektrodenarray in einer weiteren biologischen und damit auch elektrisch veränderten Umgebung untersucht. Dazu wird hier das System der Hefezellen gewählt, da es zum einen leicht zugänglich ist (Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, Institut für Experimentelle Physik, Abteilung Biophysik) und zum anderen einige elektrische Eigenschaften der Hefen bekannt sind. Die Hefezellen wurden mittels dielektrischer Spektroskopie in einem Frequenzbereich von 10 kHz bis 10 GHz untersucht [Asami und Yonezawa, 1996] und hinsichtlich ihrer Zellteilung analysiert [Asami et al., 1999]. Weiterhin wurde beobachtet, dass bei dem Fließen eines bestimmten Stromes in das System Elektrolyt/ Hefezellen die Hefezellen gezielt abgetötet werden können [Guillou und El Murr, 2002], was von großer Bedeutung für die Medizin und die Nahrungsmittelindustrie ist.

Im Folgenden werden der Stoffwechselprozess der Hefezellen und die elektrischen Eigenschaften der elektrolytischen Pufferlösung beschrieben. Diese beiden Komponenten und deren Zusammenwirken sind wichtig, damit die experimentellen Daten richtig interpretiert werden können.

2.3.4. Energiestoffwechsel der Hefezellen

Für eine weiterführende Charakterisierung des Interfaces wird eine andere Umgebung als die bisher verwendete benötigt. Die Hefezellen erfüllen diese Voraussetzung zum einen dadurch, dass ein anderer Elektrolyt als Pufferlösung (KH_2PO_4) dient. Die verwendete Pufferlösung und die Hefezellen bilden einen starken Elektrolyten, der sich in seinen Eigenschaften von denen eines schwachen, wie im vorhergehenden Fall, unterscheidet. Zum anderen kann der Stoffwechsel der Hefezellen durch die Zugabe von Glukose angeregt werden. In dem sehr komplexen Stoffwechselprozess – der Glykolyse – wird dabei die Glukose unter Gewinnung von ATP (Adenosintriphosphat) in Pyruvat umgewandelt. Die sich während der Glykolyse ändernden Ionenkonzentrationen und damit verbundenen Leitfähigkeiten eignen sich daher sehr gut zur weiterführenden Analyse des Elektrodenarrays.

Die Glykolyse ist ein kataboler Stoffwechselweg des Zytoplasmas, der in fast allen Organismen und Zellen vorkommt und ein bedeutender Teil des Energiestoffwechsels ist. Dieser Stoffwechselvorgang ist unabhängig davon, ob die Zellen unter aeroben oder anaeroben Verhältnissen leben. Unter aeroben Bedingungen können Organismen verschiedene Nahrungsstoffe durch oxidative Prozesse vollständig abbauen. Fehlt der Sauerstoff (anaerober Zustand), kann nur noch Glukose zur ATP-Bildung und damit zur Energiegewinnung herangezogen werden. Obwohl der Glukose-Abbau unter diesen Bedingungen bereits beim Lactat endet und nur geringe Mengen an ATP liefert, ist er für das Überleben der Zellen unter Sauerstoffmangel von entscheidender Bedeutung (Koolman und Röhm, 1998).

Bei der Glykolyse wird Glukose in Pyruvat, umgewandelt, wobei je Mol Glukose zwei Mol Pyruvat erzeugt werden. Unter Energiegewinnung wird das ATP durch Enzyme hydrolytisch in ADP (Adenosindiphosphat) bzw. AMP (Adenosinmonophosphat) gespalten, wobei jeweils etwa 32.6 kJ/mol oder 64.3 kJ/mol Energie frei werden [Lehninger et al., 1995]. Vereinfachend kann die Glykolyse in zwei Stufen - den oberen und unteren Teil - gegliedert werden, die jeweils fünf enzymatische Reaktionen umfassen (vgl. Abb. 2.15). Die einzelnen Die chemische Formel der Gesamtreaktion lautet:



Bei der Glykolyse in Gl. 2.32 ist NAD^+ das Oxidationsmittel. Das durch die Reduktion entstandene NADH muss oxidiert werden, wenn die Glykolyse zur Generierung von ATP genutzt werden soll. Bei den Hefezellen kann die Reduktion auf zwei verschiedenen Reaktionswegen erfolgen. Unter aeroben Bedingungen wird NAD^+ über die Atmungskette regeneriert, während es in einer anaeroben Umgebung bei einer Folgereaktion von Pyruvat zu Ethanol oxidiert wird.

2. Grundlagen

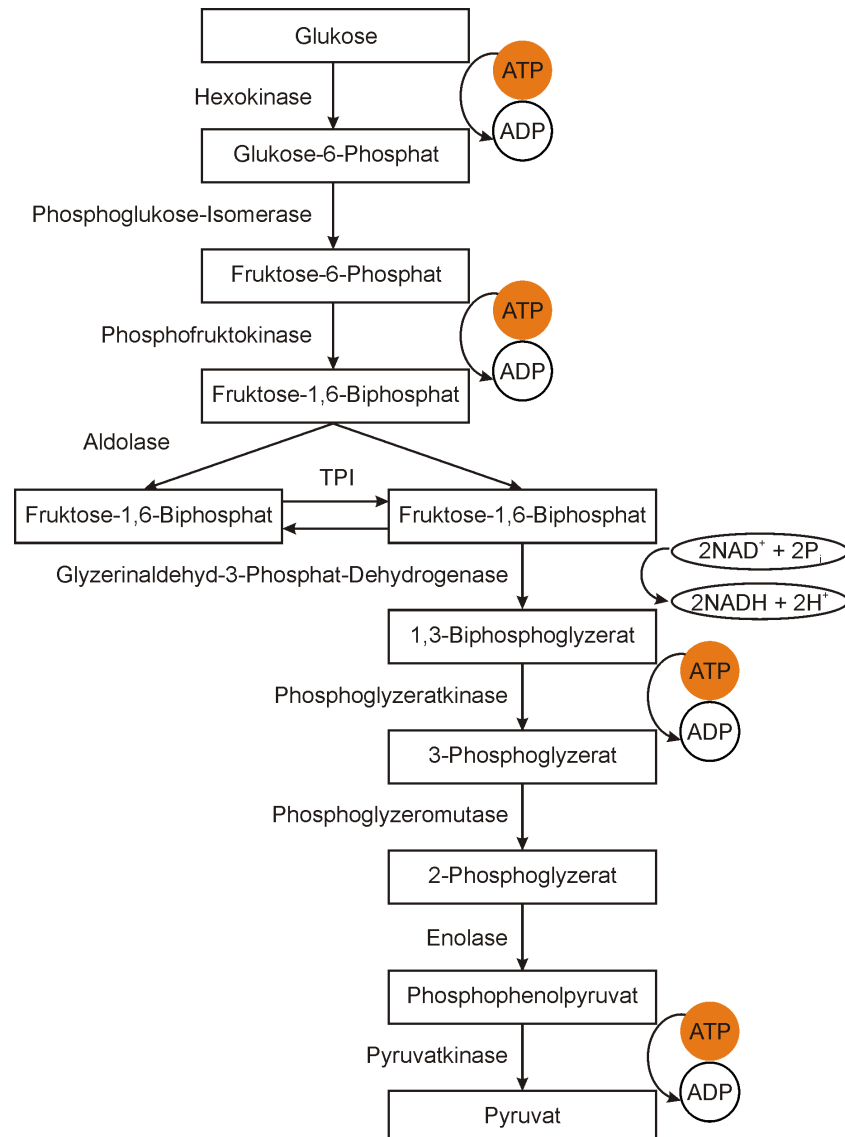


Abb. 2.15: Der glykolytische Abbau von Glukose zu Pyruvat (nach [Lehninger et al., 1995])

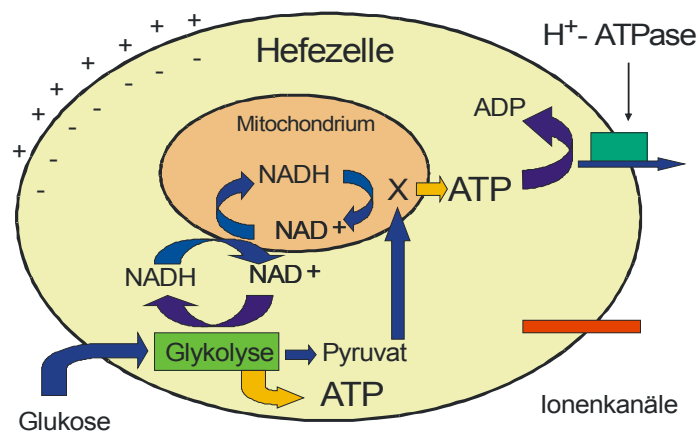


Abb. 2.16: Schema zur Energiegewinnung einer Hefezelle durch Glykolyse und Zellatmung bei gleichzeitiger Produktion von NADH, Aufbau einer Potentialdifferenz an der Zellwand durch ATP-verbrauchende H⁺-Pumpen (X ≡ Tricarbonsäurezyklus)

2.3.5. Glykolytische Oszillationen von *Saccharomyces carlsbergensis*

Die Bierhefe *Saccharomyces carlsbergensis* gewinnt durch die Glykolyse Energie in Form von ATP, welches für Stoffwechselprozesse benötigt wird. Dieser Prozess liefert in einer Nebenreaktion (vgl. Abb. 2.16) NADH-Moleküle, die unter Einstrahlung von ultraviolettem Licht $\lambda = 340$ nm bei einer Wellenlänge von $\lambda = 460$ nm fluoreszieren [Guilbault, 1990]. Durch die Detektion des emittierten Lichtes kann der NADH-Gehalt der Hefezellen und damit der qualitative Energiegehalt der Zellen bestimmt werden. Typische Glykoseoszillationen von Hefezellen und zellfreiem Hefeextrakt sind in Abb. 2.17 bzw. Abb. 2.18 dargestellt.

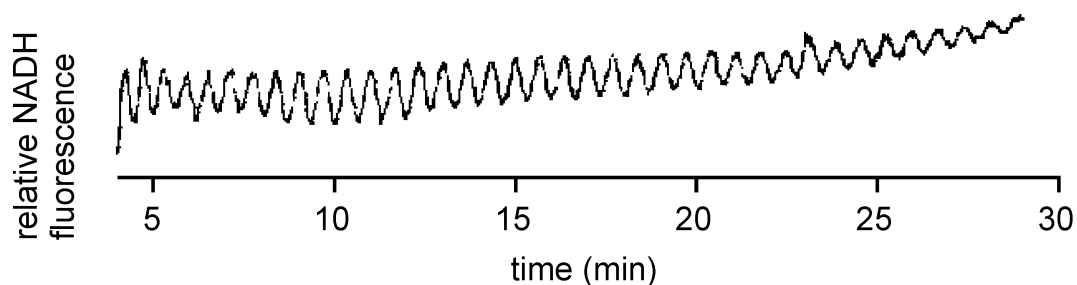


Abb. 2.17: Glykolytische Oszillationen nach Zugabe von 20 mM Glukose und 4 mM KCN zur Synchronisation der Hefezellen [Reijenga et al., 2001]

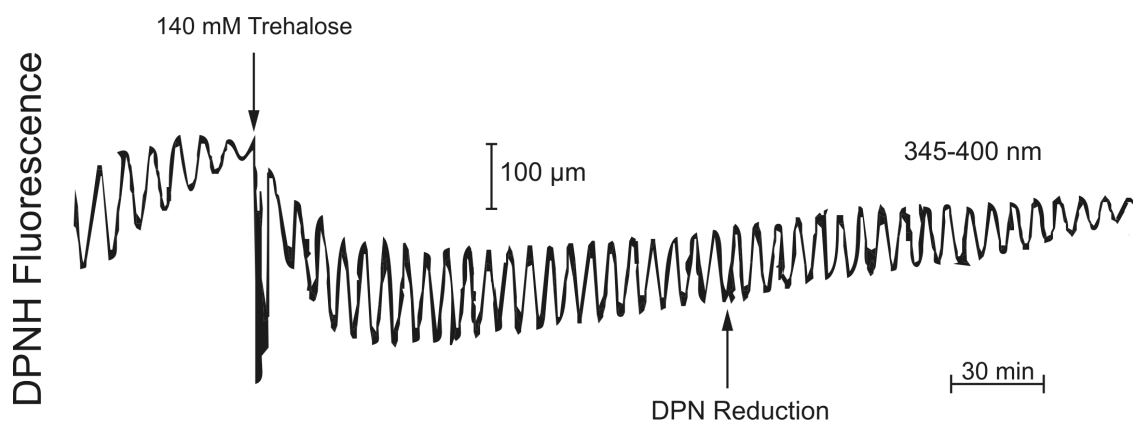


Abb. 2.18: Glykolytische Oszillationen in Hefeextrakt nach der Zugabe von 0.14 mM Trehalose [Pye and Chance, 1966]

Die Beschriftung DPNH-Fluoreszenz ist eine veraltete Bezeichnung und entspricht der heutigen Bezeichnung NADH [Karlson et al., 1994].

2.3.6. Impedanzmessungen an Hefezellen

Wegen der sich ändernden Ionenkonzentrationen während der Glykolyse und damit verbunden der Membranleitfähigkeit sind die Hefezellen für Impedanz-Messungen sehr interessant. So sind verschiedene Dispersionen bekannt, die charakteristisch für Hefezell-Lösungen sind. Die α -Dispersion tritt bei geringen Frequenzen von ca. 1 kHz auf, verursacht durch die Verschiebung von Ionen, die die Zellmembran umgeben [Asami, 2002]. Bei höheren Frequenzen entsteht eine β -Dispersion, die noch einmal in die Dispersionen β_1 und β_2 aufgeteilt wird. Die β_1 -Dispersion entsteht, weil die polarisierte Zellmembran der angelegten Frequenz von einigen MHz nicht mehr folgen kann. Die β_2 -Dispersion, bei etwa 50 MHz, wird dem Einfluss der Vakuolen in der Zelle zugeschrieben [Asami und Yonezawa, 1996]. Oberhalb von 1 GHz tritt schließlich die γ -Dispersion auf, die durch den Dipolcharakter der Wassermoleküle hervorgerufen wird, die sich bei dieser Frequenz nicht mehr im elektrischen Feld ausrichten können [Asami, 2002].

Diese Dispersionen können mit einem Ersatzschaltbild durch entsprechende R-C-Glieder dargestellt werden [Gimsa und Wachner, 1998]. Durch den eingeschränkten Messbereich von 20 Hz bis 1 MHz sind für diese Arbeit nur die α - und die β_1 -Dispersion von Bedeutung. In der zitierten Literatur wird ein Frequenzbereich betrachtet, in dem die Auswirkung der Doppelschicht über den Elektroden komplett vernachlässigt werden kann. Die Messungen werden an Zellsuspensionen durchgeführt, in denen eine Gleichverteilung der Zellen vorausgesetzt wird. Um ein homogenes elektrisches Feld zu gewährleisten, wurden planparallele Elektroden verwendet [Gimsa und Wachner, 1998; Asami, 2002].

Im Gegensatz zu diesen Annahmen steht die Fingerstruktur unserer Elektroden, die ein inhomogenes elektrisches Feld erzeugen. Lediglich zu Beginn der Messungen kann von einer Gleichverteilung der Hefezellen ausgegangen werden, da diese im Laufe der Zeit zu Boden sinken und sedimentieren. Zusätzlich wurden Impedanzmessungen in einem Frequenzbereich aufgenommen, in dem die elektrochemische Doppelschicht nicht vernachlässigt werden kann. Aufgrund dieser abweichenden experimentellen Randbedingungen kann das Modell von Gimsa und Wachner [Gimsa und Wachner, 1998] nicht auf unsere Elektroden übertragen werden.

3. Versuchsaufbau

In diesem Kapitel werden die Herstellung der Elektroden und verschiedene Messapparaturen zur elektrischen Charakterisierung des Systems, bestehend aus Stimulationselektroden, Elektrolyt und lebenden Zellen beschrieben. Weiterhin werden die Versuchsplätze, die zum Teil neu aufgebaut oder erweitert werden mussten, vorgestellt.

3.1. Herstellung der Metallelektroden

Als Substrat für die verschiedenen Schichtstrukturen wurden Deckgläschen mit einer Größe von $24 \times 24 \text{ mm}^2$ (Assistent, Sondheim) verwendet. Zur Verbesserung der Haftung der Neuronen auf den Deckgläschen wird die Oberfläche mit Säuren und Basen vorbehandelt (Anhang 8.1). Der Vergleich der beiden AFM-Aufnahmen¹ in Abb. 3.1 verdeutlicht die Ausbildung von Haftzentren für die nachfolgende Beschichtung mit Poly-D-Lysin (PDL) und die Neuronen.

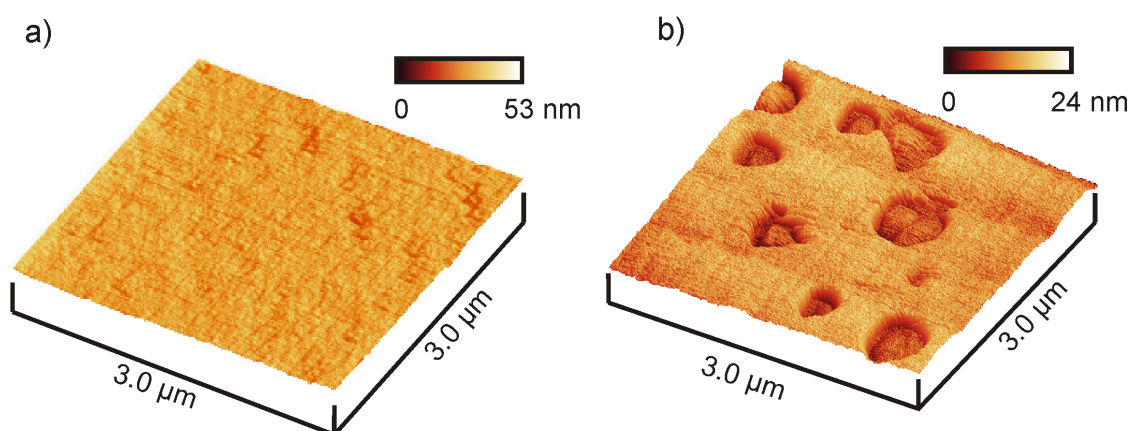


Abb. 3.1: AFM-Aufnahmen eines Deckgläschens a) vor und b) nach dem Ätzen

¹ gemessen von Dr. A. Krtschil

3. Versuchsaufbau

Nach der Behandlung der Deckgläschen werden diese direkt vor dem Abscheiden der Metallelektroden kurz gereinigt. Der Reinigungsprozess findet in einem Ultraschallbad statt. Für jeweils 5 Minuten werden die Deckgläschen in Aceton, 1,2-Isopropanol und Methanol gereinigt. Zwischen jeden Lösungsmittelwechsel und abschließend werden die Deckgläser für 5 Minuten in destilliertem Wasser gesäubert. Im Stickstoffstrom werden die Glassubstrate getrocknet und dann in die Elektrodenstrahlverdampfungsanlage eingelegt. Dort werden bei einem Druck von ca. 10^{-3} Pa die Metallschichten aufgedampft. Mit Hilfe einer Schattenmaske wird die gewünschte Elektrodenform realisiert. Alle Elektrodenstrukturen bestehen aus einer 5 nm dünnen Titan-Haftschrift und der 50 nm dünnen Gold-Elektrode.

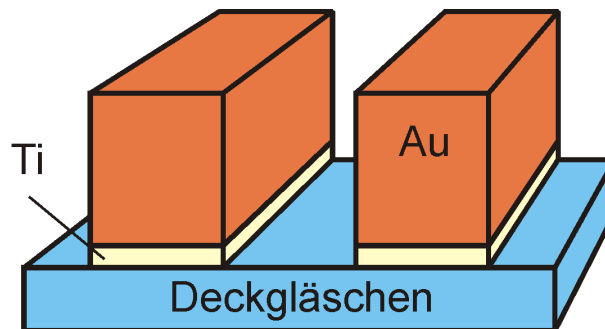


Abb. 3.2: Elektrodenaufbau, bestehend aus einer 5 nm Titan-Haftschrift und der 50 nm dünnen Gold-Elektrode

Die Struktur, die am häufigsten in den gemachten Experimenten verwendet wurde, ist die Fingerstruktur in Abb. 3.3 b). Durch die Herstellung der Wolfram-Schattenmasken mittels elektroerosivem Ätzen liegt die maximale Auflösung bei ca. 300 μm . Für kleinere Strukturen, wie z.B. für die Herstellung von Ableitstrukturen in Abb. 3.3 c) muss ein anderes Verfahren angewendet werden. Die Ableitstrukturen wurden daher mittels Photolithographie hergestellt.

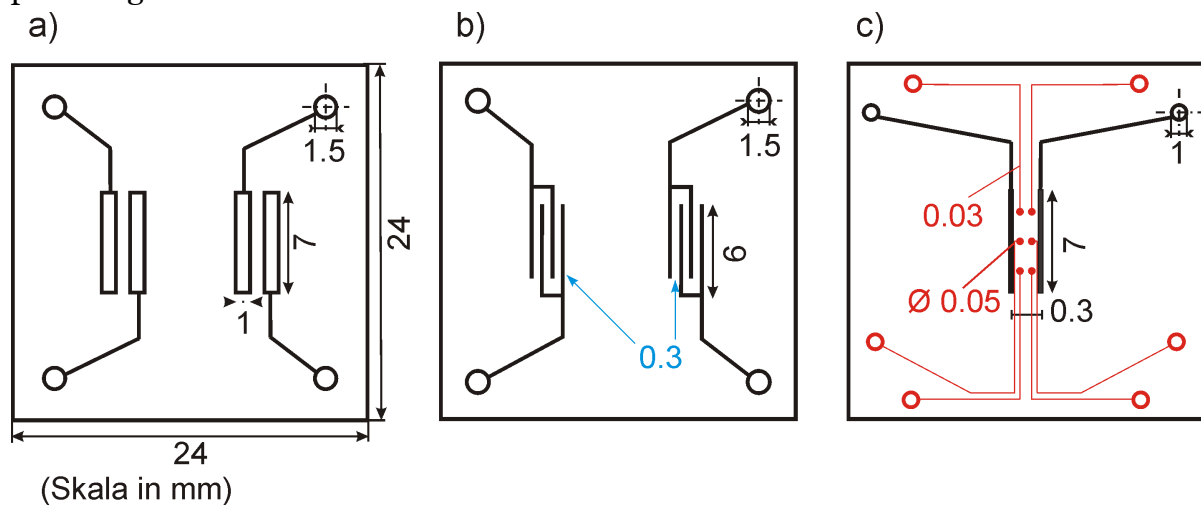


Abb. 3.3: Verwendete Elektrodengeometrien,
a) großflächige Elektrode, b) Fingerelektrode und c) Mikroelektrode

3.1.1. Bemerkungen zur Lithografie

Die Photolithografie ist ein maskengestütztes Verfahren. Die Maske, die aus einem Glaträger mit darauf aufgebrachtten Absorberstrukturen besteht, wird mit Licht im Wellenlängenbereich zwischen 200 nm und 450 nm auf das mit einem lichtempfindlichen Lack (Photoresist) beschichteten Substrat abgebildet. Je nach dem, ob es sich dabei um einen Positivlack oder einen Negativlack handelt, werden die bestrahlten Bereiche im anschließenden Entwicklungsprozess leicht gelöst bzw. nicht entfernt [Sachse, 1995].

Die Photolithografie-Strecke ist zur Herstellung der Ableitelektroden eingerichtet worden. Dazu wurden ein entsprechender Spincoater (Lackschleuder) der Firma Süss Mikrotec AG, eine Heizplatte der Firma Harry Gestigkeit GmbH und ein Mask' Aligner verwendet. Ebenfalls wurden verschiedene Photolacke der Firmen Micro resist technology und Allresist auf ihre Verwendbarkeit für die Strukturgröße und die vorhandenen Geräte getestet.

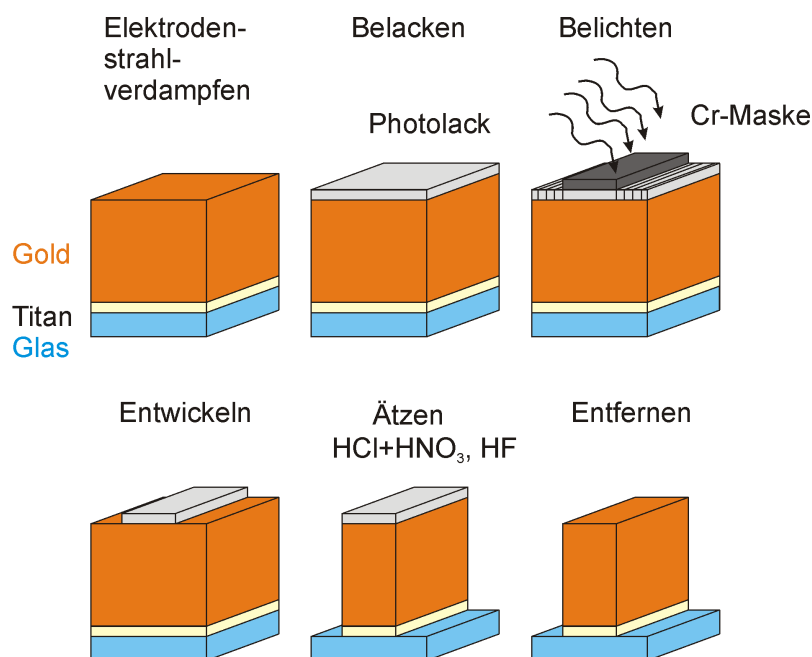


Abb. 3.4: Einzelne Schritte der Photolithografie

Bevor die Photolacke zur Herstellung der Ableitstrukturen verwendet werden können, müssen sie auf ihre Bioverträglichkeit untersucht werden. Nur so kann eine toxische Wirkung mittels Photolithografie hergestellter Strukturen von Anfang an ausgeschlossen werden. Dazu wurden die sechs vorhandenen Lacke **ma-P 205**, **ma-P 215S**, **ma-P 1205**, **mr-P1105** der Firma Micro resist technology und **AR-P 3020** bzw. **AR-P 3220** der Firma Allresist mit einem Pinsel auf die Deckgläschen aufgebracht, getrocknet und anschließend in den Zyklus der Gliapräparation gegeben.

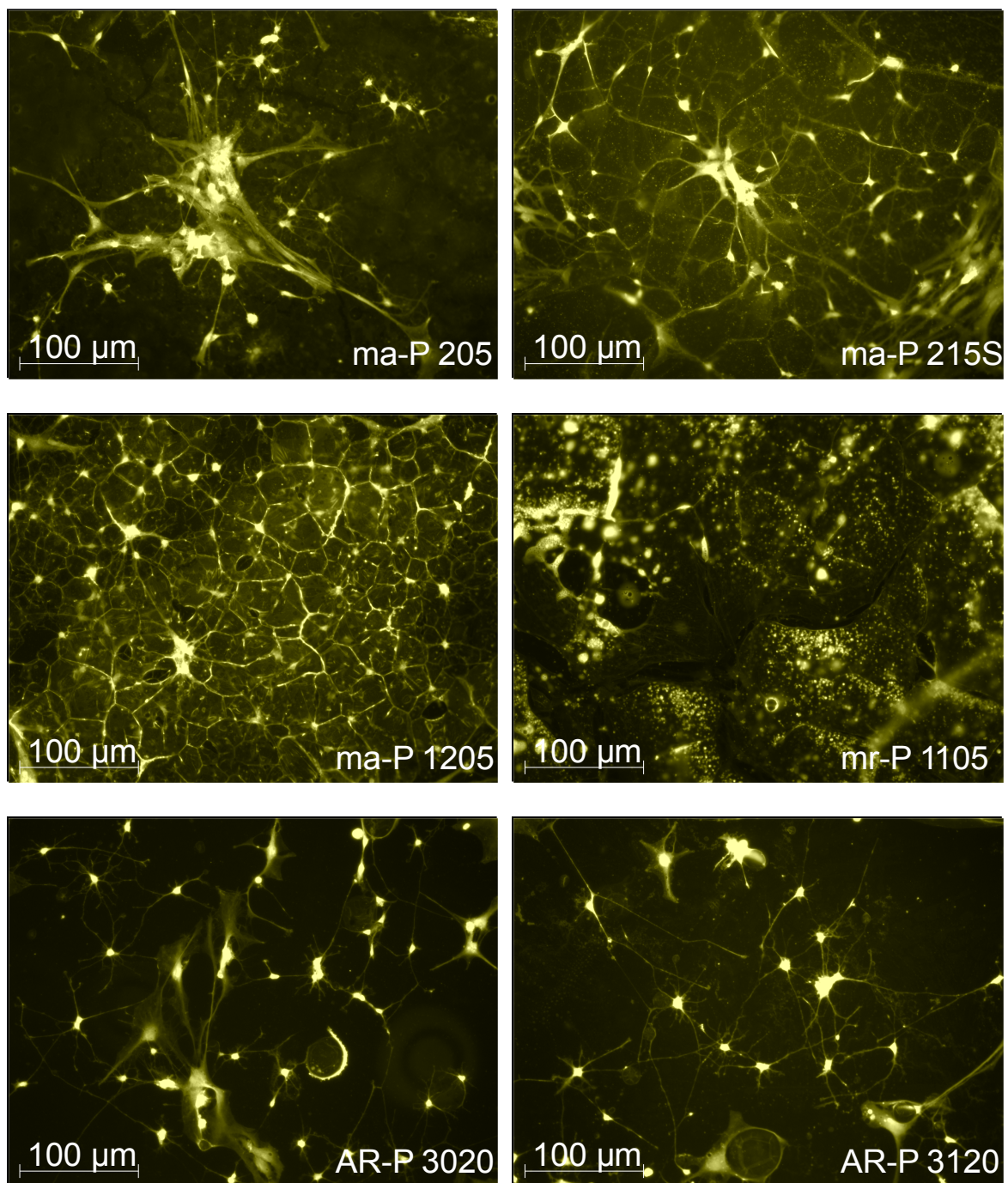


Abb. 3.5: Mikroskopische Aufnahmen der mit Glia-Zellen bewachsenen Photolacke (14 DIV), (DAPI-Färbung)

Auf allen getesteten Photolacken haben sich Glianetzwerke ohne toxische Reaktionen ausgebildet (Abb. 3.5). Die unterschiedlichen Zelldichten resultieren aus den manuell und damit inhomogen aufgetragenen Lacken. Aufgrund dieser Ergebnisse können die getesteten Photolacke für die Strukturierung mittels Photolithografie verwendet werden.

3.1.2. Bestimmen des Parametersatzes für die Lithografie

Ausgehend von den angegebenen Parametern des Herstellers wird versucht, Strukturen mittels der Photolithografie herzustellen. Dazu werden systematisch alle Parameter der Lithografiestrecke verändert, um das beste Ergebnis zu erzielen. Dazu gehören Variationen des aufgetragenen Photolackvolumens, der Schleuderzeit, der Drehzahl des Spin-Coaters, der Ausheiztemperatur und -zeit, der Belichtungsdauer, der Entwicklungszeit bzw. -konzentration und ein Einstellen des Ätzprozesses.

Da die meisten Versuche mit dem Photolack AP 3120 der Firma Allresist durchgeführt werden, wird der Name des verwendeten Lackes nur dann angegeben, wenn ein anderer als der AP 3120 verwendet wird. In über 150 Einzelversuchen werden alle auftretenden Parameter systematisch variiert und die Ergebnisse mittels Nomarski- und AFM-Aufnahmen überprüft. Anfangs werden nur sehr einfache Strukturen, die Fingerelektroden, photolithografisch reproduziert. Dabei erweisen sich die Parameter in Tab. 3.1 als geeignet, um Strukturen von ca. 300 µm Größe herzustellen.

Tab. 3.1: Parametersatz zur Herstellung Strukturen einer Größe bis 300 µm

Volume n	Schleudern	Trocknen	Belichten	Entwickeln AR 300-35	Ätzen
0.25 ml	120 s 6000 U/min	20 min 75°C	45 s	45 s Konz. 1:1	HCl + HNO ₃ HF (5%)

In dieser Anfangsphase werden zwei verschiedene Lithografie-Techniken ausprobiert: die Positiv-Entwicklung und das Lift-Off-Verfahren. Dabei stellt sich die Positiv-Entwicklung als vorteilhaft heraus, da bei dem Lift-Off-Prozess das Gold nicht konturenscharf entfernt werden kann und bereits die 300 µm großen Strukturen nicht in gleichbleibender Güte reproduzierbar sind.

Nach Ermittlung der Startwerte in Tab. 3.1 wird damit begonnen, kleinere Strukturen, die Ableitelektroden, in der Größenordnung von 20 µm herzustellen. Zu dünne oder fehlende Ableitelektroden legen den Schluss nahe, dass eine zu große Belichtungszeit vorliegt. Daher wird die Belichtungsdauer von 45 s schrittweise reduziert, um bei 20 s Belichtungszeit ein Optimum zu erreichen. Trotz einer Anpassung der weiteren Parameter (vgl. Tab. 3.2) sind die erzielten Ergebnisse nicht zufriedenstellend, da kleine Löcher (Abb. 3.6 a)) und Ablagerungen (Abb. 3.6 b)) zu erkennen sind, die im Ätzprozess zu Fehlstellen in den Zuleitungen führen.

3. Versuchsaufbau

Tab. 3.2: Parametersatz zur Herstellung der Ableitstrukturen einer Größe bis 20 μm

Volumen	Schleudern	Trocknen	Belichten	Entwickeln AR 300-35	Ätzen
0.25 ml	120 s 6000 U/min	30 min 75°C	20 s	30 s Konz. 1:1	HCl + HNO ₃ HF (5%)

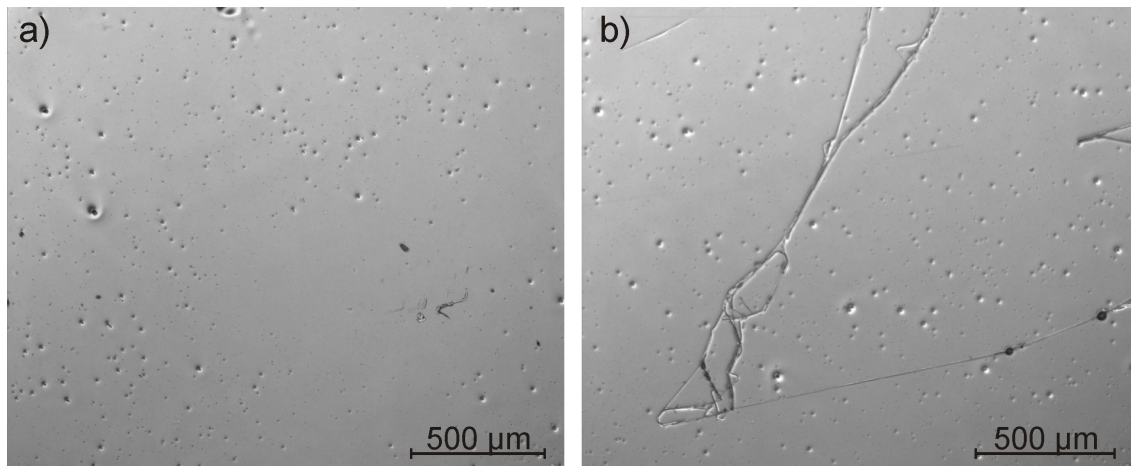


Abb. 3.6: Inhomogenitäten der Photolackoberfläche
a) Löcher im Photolack, b) Löcher und Ablagerungen

Durch die Verwendung eines Adhäsionspromoters soll die Haftung des Photolackes auf der Goldschicht verbessert und damit die Anzahl der Fehlstellen verringert werden. Es zeigt sich jedoch, dass die durch Verwendung des Adhäsionspromoters nur eine geringfügige Verbesserung der Oberflächenstruktur erreicht werden kann (Abb. 3.7 a)) und Photolackreste auf den Elektroden verbleiben (Abb. 3.7 b)).

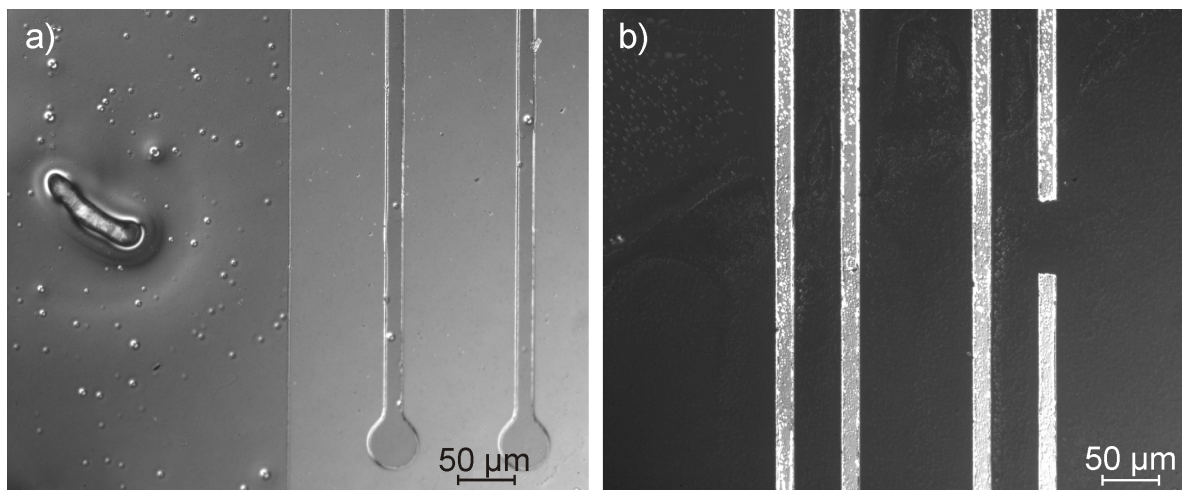


Abb. 3.7: Die Verwendung des Adhäsionspromoters verringert die Anzahl der Fehlstellen im Photolack nur unzureichend
a) Aufnahme vor dem Ätzen mit Fehlstellen,
b) Aufnahme nach dem Ätzen in Königswasser und HF und dem Entfernen des Photolackes, unterbrochene Zuleitung

Durch eine verlängerte Ultraschallbad-Reinigung der Strukturen im Remover, zum Entfernen des entwickelten Photolackes, kann keine Verbesserung erreicht werden. Dieser Effekt trat unsystematisch auf und ist wahrscheinlich auf ein inhomogenes Temperaturprofil der Heizplatte zurückzuführen, da es sich bei dem Modell nicht um eine spezielle Heizplatte zum Trocknen von Photolacken handelt. Eine höhere Temperatur und eine verlängerte Trockenzeit auf der Heizplatte reproduzierten das Auftreten von nicht-löslichen Photolackresten (Abb. 3.8). Dabei ist der thermische Energieeintrag in den Lack so hoch, dass er chemisch verändert wird. Die Lösungsmittel-Chemikalien finden keinen Reaktionspartner und der Photolack kann nicht abgelöst werden. Der auf den Elektroden verbliebene Photolack kann nur mechanisch oder mit Säuren entfernt werden, wobei beide Methoden die Elektroden zerstören. Ein Verbleiben der Photolackreste auf den Elektroden ist nicht wünschenswert, weil dann keine homogenen Wachstumsbedingungen für die Neuronen gegeben sind.

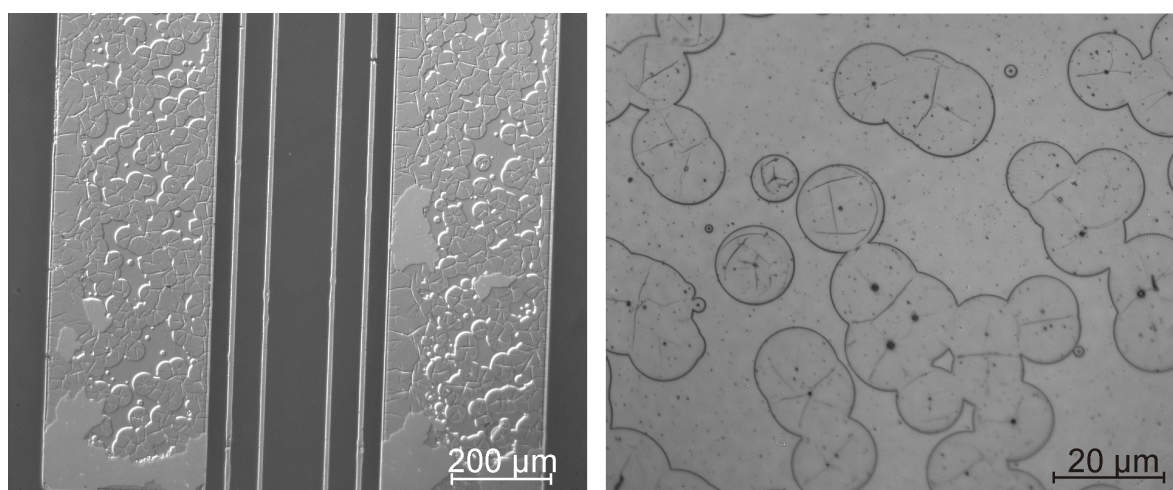


Abb. 3.8: Thermisch zerstörter Photolack durch zu langes Trocken (3 Stunden bei 75°C) nach den Ätz- und Reinigungsprozessen

Auch in Folgeexperimenten kann das zufällige Auftreten des Effektes von thermisch inaktiviertem Photolack nicht unterdrückt werden. Eine geringere Temperatur oder eine verkürzte Trockenzeit führen zu einer ungenügenden Aushärtung des Lackes, so dass dieser bei der weiteren Prozessierung beschädigt wird (Abb. 3.9 a)).

Das Problem der auftretenden Löcher im Photolack kann schließlich durch eine 5:1-Verdünnung des Entwicklers erreicht werden. Der Entwickler, der sowohl unbelichteten als auch belichteten Photolack (mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten) auflöst, wirkt dann selektiver. Das Ablösen des belichteten Lackes ist nach wie vor gegeben. Allerdings werden dünne, unbelichtete Photolack-Flächen während des Entwicklungsprozesses nicht mehr so großporig freigelegt (Abb. 3.9 b)).

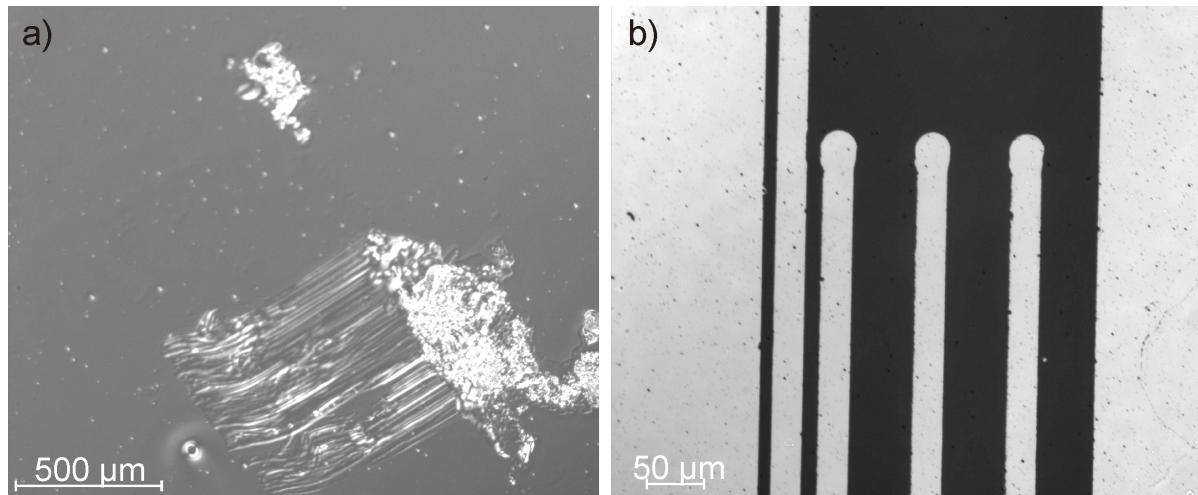


Abb. 3.9: a) Pinzettenabdruck auf einem nicht vollständig ausgehärteten Photolack, b) Entwickeln der Lackstruktur in 5:1 verdünntem Lösungsmittel, nur noch sehr kleine Löcher, die die Zuleitungen nicht unterbrechen

Tab. 3.3: Parametersatz zur Herstellung der Ableitstrukturen einer Größe bis 20 µm

Volumen	Schleudern	Trocknen	Belichten	Entwickeln AR 300-35	Ätzen
0.25 ml	120 s 6000 U/min	30 min 75°C	20 s	30 s Konz. 5:1	HCl + HNO ₃ HF (5%)

Abschließend werden die Elektroden mit einem Golddraht (\varnothing 50 µm) kontaktiert. Der leitfähige Klebstoff „Leit-C“ der Firma Neubauer auf Kohlenstoffbasis gewährleistet dabei reproduzierbare Kontakte mit konstantem Übergangswiderstand. Dabei kann der Übergangswiderstand im Vergleich zu dem Leitungswiderstand der Goldbahnen vernachlässigt werden [Günther, 2003].

3.2. Elektrische Methoden

Wie schon aus den elektrischen Grundlagen ersichtlich, spielt der komplexe Widerstand der Elektroden eine große Rolle für die Pulseinkopplung in den Elektrolyten und die Zellen. Die für die Charakterisierung des System notwendigen Impedanzmessungen werden mit einem Präzisions-LCR Meter HP4284A der Firma Hewlett Packard durchgeführt. Dieses Messgerät eignet sich zur Impedanzanalyse in einem Frequenzbereich von 20 Hz bis 1 MHz, bei messbaren Kapazitäten und Widerständen von 1 fF bis zu 10 F bzw. 0.01 mΩ bis 100 MΩ [HP4284A]. Um störende Einflüsse, wie das 50 Hz-Rauschen, während der Messungen zu minimieren, werden die Messungen innerhalb eines

abgeschirmten Metallgehäuses durchgeführt. Innerhalb des Metallgehäuses befinden sich ausschließlich abgeschirmte Kabel, die die Streukapazitäten verringern. Um den Einfluss des Kabelwiderstandes zu eliminieren, werden Strom- und Spannungsmesskreis voneinander getrennt, wie die Schaltskizze in Abb. 3.10 illustriert.

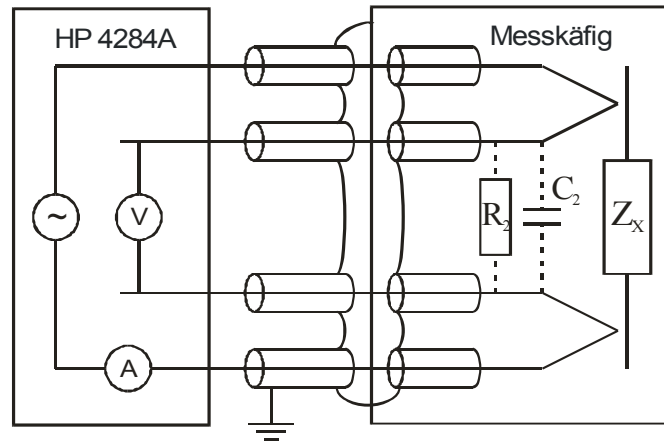


Abb. 3.10: Prinzipskizze zum Bestimmen der Impedanz Z_x unter Berücksichtigung einer Streukapazität C_2 und einem Leckwiderstand R_2 [Günther, 2004]

Die Größe der Streukapazität C_2 und des Leckwiderstandes werden mit $C_2 = 0.7 \text{ pF}$ bzw. $R_2 = 10^{15} \Omega$ abgeschätzt [Günther, 2003]. Ein Vergleich der Simulation einer Impedanzmessung mit und ohne Streuparameter ergibt keinen Unterschied. Daher kann geschlossen werden, dass die Streuparameter keinen Einfluss auf die Größenordnung der Admittanz des gemessenen System haben [Günther, 2004]. Der zufällige Fehler der Messbrücke wird mit 6% angegeben, der sich aber nicht signifikant in den Messungen auswirkt [HP4284A].

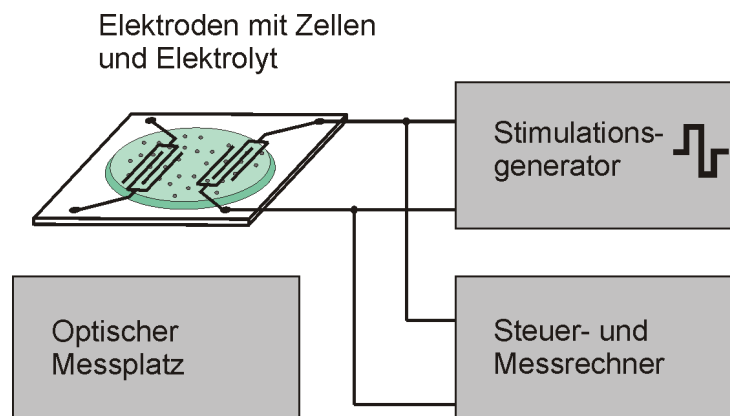


Abb. 3.11: Schematischer Aufbau des Versuchsplatzes zur Stimulation

Für die Stimulationsversuche wird ein Pulsgenerator (HP 8110A, Hewlett Packard) verwendet, wobei ein Computer mit integrierter AD/DA-Karte (Data Translation GmbH) den Pulsgenerator steuert und Stimuli detektiert. Ein Schema des Versuchsaufbaus ist in Abb. 3.11 dargestellt.

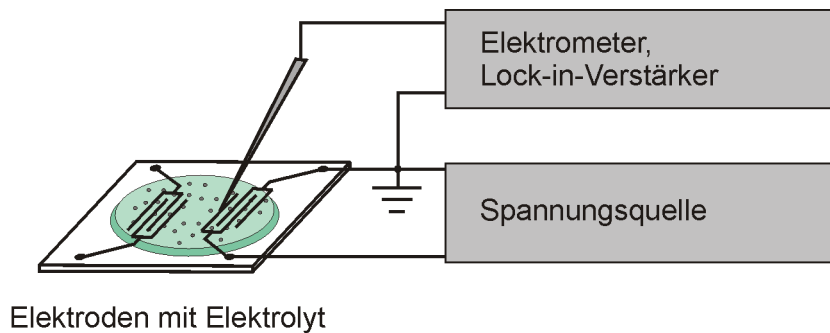


Abb. 3.12: Schematischer Aufbau des Versuchsplatzes zur Stimulation

Der Potentialverlauf zwischen den Elektroden wird mittels eines Nadelprobers in Elektrodenhöhe (50 nm) mit einer Schrittweite von 10 μm ausgemessen. Für DC-Messungen wird ein Elektrometer und für AC-Messungen ein Lock-in-Verstärker verwendet (Abb. 3.12).

3.3. Kultivierung von Neuronen

Im folgenden Kapitel werden die biologischen Methoden beschrieben die notwendig sind, um an Neuronennetzwerken Stimulationsexperimente durchzuführen. Dabei wird im Detail auf die Präparation, die verwendete Ca^{2+} -Imaging-Technik und die Stimulation eingegangen. Dabei wurde die Neuronenpräparation an der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg im Institut für Physiologie durchgeführt.

3.3.1. Präparation der Neuronen

Vorbereitung der Zellkulturschalen

In die Petrischalen (\varnothing 60 mm) wird mit einer Kniehebelpresse eine zentrierte kreisförmige Öffnung von ca. 20 mm Durchmesser gestanzt. Um Sterilität zu gewährleisten, wird die Kulturschale beidseitig 15 min lang mit UV-Licht bestrahlt. Die Deckgläser mit den Elektrodenstrukturen werden mit einem Wachs, einem speziellen Paraffin (Firma VWR) -Vaseline (Firma Fluka)-Gemisch im Verhältnis 3:1, von unten an der Petrischale befestigt. Nach dem Auftragen des Wachses zwischen Deckglas und Petrischale wird das mit einem Gewicht beschwerte Deckgläschen auf die Petrischalenöffnung gelegt und für 20 min bei

70°C gelagert. Dies gewährleistet, dass das flüssige Wachs Petrischale und Deckglas so abdichtet, dass die Kulturmedien nicht auslaufen. Abschließend werden die Kulturschalen in einen speziell entwickelten Halter eingebaut (Abb. 3.13), der das Anschließen der Stimulationselektroden an den Stimulationsgenerator vereinfacht.

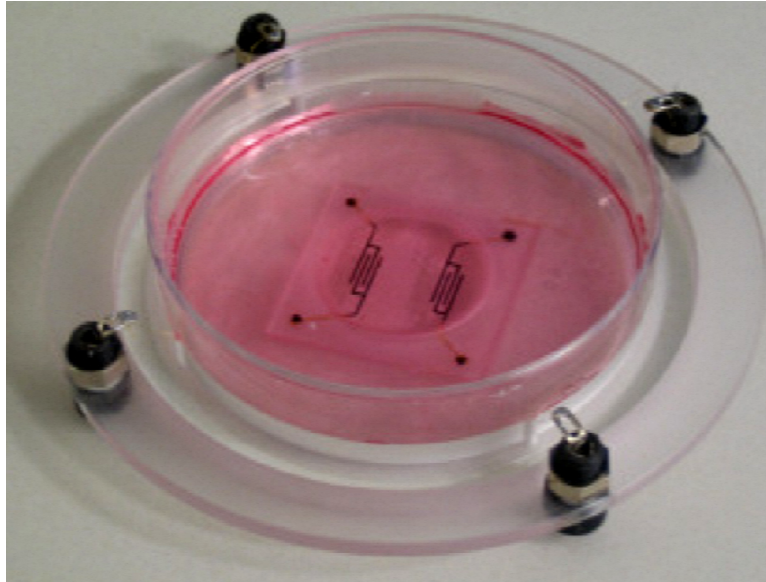


Abb. 3.13: Kulturschalenhalter mit vier Kontaktpunkten für Golddrähte und DMEM als Kulturmedium [Nörenberg, 2006]

Abschließend werden die Innenseite und der Deckel der Kulturschale 20 Minuten mit UV-Licht bestrahlt. Nach dem Zusammenbau der Schalen werden die Petrischalen mit Poly-D-Lysin (PDL), einem Eiweißmolekül (Sigma) beschichtet, welches haftunterstützend für Neuronen wirkt.

Astroglia-Kultur

Durch eine gemeinsame Plattierung von Neuronen und Glia-Zellen wird die Neuronenproliferation gehemmt [de Lima und Voigt, 1999]. Da die von den Glia-Zellen abgegebene Stoffe aber notwendig für das Auswachsen der Neuronen sind [Kandel et al., 2000], müssen beide Zellarten in einer Kulturschale vorhanden sein. Daher werden beide Zelltypen räumlich voneinander getrennt. Dies wird durch einen Silikon-bestrichenen Edelstahl- bzw. Plexiglasring realisiert, der den Elektrodenbereich von dem Rest der Kulturschale separiert. Bis zur Plattierung der Glia-Zellen verbleiben die Kulturschalen Inkubator bei 36°C und 5% CO₂, wobei sich 5 ml DMEM sowie 10% FKS außerhalb des Ringes und 1 ml DMEM sowie 10% fötales Kälberserum (FKS) innerhalb des Ringes befinden.

Nach der Dekaptation von neugeborenen Sprague Dawley Ratten (Po) oder einen Tag alten Ratten (P1) wird der Schädel entlang der Mittellinie geöffnet. Das entnommene Gehirn wird in Hank's Kulturmedium (Invitrogen) überführt. Anschließend werden beide

3. Versuchsaufbau

Kortizes unter einem Binokular mechanisch zerkleinert. Die so gewonnenen Gewebeteile werden mittels einer Pasteurpipette in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und mit Kanülen unterschiedlicher Größe (G21, G25 mit \varnothing 0.8 mm und 0.5 mm)) mechanisch dissoziiert. Diese Zellsuspension wird in 20 ml DMEM und 10% FKS enthaltende Gliakulturflaschen überführt und im Inkubator kultiviert. Innerhalb von zwei Wochen bildet sich ein konfluenter Glia-Zell-Rasen, der notwendig für die Plattierung in den Kulturschalen ist. Nach Ablauf der zweiwöchigen Kultivierung werden die Gliakulturen über Nacht bei Raumtemperatur mit 180 U/min geschüttelt. Die Erschütterungen trennen die Astrogliazellen, die ausschließlich am Boden haften, von den anderen Zellen. Die abgelösten Zellen werden durch dreimaliges Waschen mit 36°C warmen DMEM und Hank's Kulturmedium aus der Kulturflasche entfernt. Die am Boden haftenden Astrogliazellen werden enzymatisch durch ein Hank's-Trypsin-EDTA-Gemisch (Invitrogen) abgelöst und dissoziiert. Nach 7 min wird Trypsin durch die Zugabe von 10% FKS in DMEM inaktiviert. Die so vorbereitete Zellsuspension wird in Zentrifugenröhrchen gegeben und 10 Minuten mit 1200 U/min zentrifugiert. Der so gewonnene Zellabsatz wird nach Entfernen des Überstandes in 5 ml 10% FKS in DMEM resuspendiert. Die Anzahl der lebenden und toten Zellen wird in einer Neubauer-Zählkammer durch Färbung von 100 μ l Zellsuspension mit 1 μ l mit Propidium-Iodid bestimmt. Fünf Tage vor der Neuronenkultivation werden die Glia-Zellen in den äußeren Bereich der Petrischalen mit einer Dichte von ca. 250 Glia-Zellen je mm² plattiert [Nörenberg, 2006].

Neuronen-Kultur

Einen Tag, bevor die Neuronen in den Petrischalen kultiviert werden, muss das serumhaltige Medium der Glia-Zellen durch serumfreies ersetzt werden. Die Edelstahl- oder Plexiglasringe werden entfernt und die Petrischale mit DMEM gewaschen. Abschließend werden 6 ml auf 36°C erwärmtes N₂ Kulturmedium mit Hormonen (vgl. Anhang 8.2) in die Kulturschalen gegeben. Die verbleibende Zeit bis zur Neuronenplattierung ist ausreichend, damit die Glia-Zellen das Kulturmedium mit Nährstoffen für die Neuronen konditionieren.

Für die Neuronengewinnung wird eine trächtige Sprague Dawley Ratte am embryonalen Tag 16 (E16) durch eine intraperitoneale Injektion mit Chloralhydrat (Roth, 4% Chloralhydrat, 1 ml/ 100 g Körpergewicht) anästhesiert und nach Entnahme der Embryonen durch einen Kaiserschnitt mit einer kardial injizierten Überdosis an Chloralhydrat (Roth, 10% Chloralhydrat, 1 ml/ 100 g Körpergewicht) getötet. Nach der Überführung der Embryonen aus dem Amnion in Hank's Medium werden die Gehirne aus dem Schädel getrennt und nach dem Entfernen der Hirnhäute die Kortizes beider Hemisphären oberhalb der telencephalen Anlagen abgetrennt. Analog der Verwendung einer Pasteurpipette bei der Astro-

Glia-Präparation, wird das Gewebe zerkleinert und in Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Dissoziation des Neuronengewebes erfolgt enzymatisch 25 min lang bei 36°C durch ein Trypsin-EDTA-Gemisch (Invitrogen, Karlsruhe). Die nachfolgende Protease-Aktivität wird durch Verwenden einer Trypsin-Inhibitor/DNase Lösung (Sigma) unterbunden. Nach einmaligem Waschen mit Hank's Medium werden 900 µl Hank's Medium der Zellsuspension hinzu gegeben. Nach mechanischer Dissoziation mittels zweier Kanülen unterschiedlicher Größe (G21, G25 mit Ø 0.8 mm und 0.5 mm) wird die Zellsuspension 10 min zentrifugiert. Der erhaltene Zellabsatz wird nach Entfernen des Überstandes in 7 ml Hank's Medium resuspendiert. Das Verhältnis von lebenden zu toten Nervenzellen wird erneut durch eine Propidium-Iodid-Färbung in Verbindung mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Abschließend werden in die mit Glia-Zellen vorbereiteten Kulturschalen Neuronen mit einer Dichte von 300 Zellen/mm² plattiert und im Inkubator kultiviert.

Der Mitoseblocker AraC wird nach sechs Kultivierungstagen (*days in vitro*, DIV) dem Medium zugegeben, um eine weitere Zellteilung zu verhindern. Am siebten Tag in Kultur wird in allen Petrischalen ein Drittel des Mediums durch frisches N2 ersetzt.

3.3.2. Calcium-Fluoreszenz-Technik (Ca²⁺-Imaging)

Die Calcium-Fluoreszenz-Technik wird angewendet, um intrazelluläre Calcium-Konzentrationsänderungen zu detektieren. Bei der Entstehung eines Aktionspotentials wird die Zellmembran depolarisiert und verschiedene Ionenkanäle werden geöffnet. Bei dem Calcium-Imaging steht dabei der Einstrom der [Ca²⁺]_i-Ionen aufgrund von Aktionspotentialen im Vordergrund.

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, den Farbstoff Fluo-3 AM (Molecular Probes, MoBiTec) in Zellen einzuschleusen, der in Abhängigkeit vom Bindungszustand der [Ca²⁺]_i-Ionen seine Fluoreszenzeigenschaften ändert. Nach einer erfolgreichen Stimulation oder spontanen Depolarisation der Nervenzellen erhöht sich die intrazelluläre Calcium-Konzentration. Dadurch wird die Fluoreszenz des calcium-bindenden Farbstoffs Fluo-3 AM (kurz: Fluo-3) bis zu 200-fach verstärkt [Harkins et al., 1993]. Unter Einstrahlung von monochromatischem Licht spezifischer Wellenlänge ($\lambda = 506 \text{ nm}$) kann die Änderung der Fluoreszenzintensität bestimmt werden. Typischerweise emittiert Fluo-3 nach Calcium-Bindung Licht mit einer Wellenlänge von 526 nm [Molecular Probes, 2002].

Der Farbstoff Fluo-3 (Strukturformel siehe Abb. 3.14), ein Penta-Aceto-Oxy-Methylester und ein fettlösliches Molekül, kann durch die Zellmembran in die Zelle diffundieren. Dort werden die Estergruppen des Farbstoffes enzymatisch von Esterasen hydrolysiert und das so entstandene Molekül ist nicht mehr membranpermeabel.

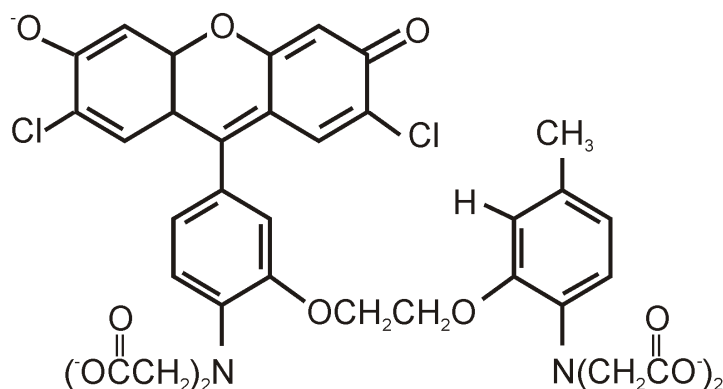


Abb. 3.14: Erweiterte Strukturformel des Ca^{2+} -Indikators Fluo3-AM [Invitrogen]

Um die Calcium-Imaging Methode anwenden zu können, muss der Farbstoff in die Zellen diffundieren. Daher werden vor Beginn der Messungen 50 µg Fluo-3 in 45 µl DMSO gelöst. Von diesem Ansatz werden 15 µl mit 3 ml aus der Kulturschale entnommenem Medium vermischt. Das restliche Kulturmedium wird aus der Kulturschale entfernt und das farbstoff-enhaltende Kulturmedium in die Petrischale zurückgegeben. Für einen Zeitraum von 60 Minuten verbleibt die Kulturschale im Inkubator bei 36°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 . Der Zeitraum von einer Stunde gewährleistet, dass hinreichend viele Farbstoffmoleküle in die Zelle diffundieren. Anschließend werden die Zellen zweimal mit HEPES-gepuffertem aCSF (engl. **a**rtificial **c**erebrospinal **f**luid) gewaschen, um den restlichen extrazellulären Farbstoff zu entfernen. Die Kulturschale wird mit 6 ml aCSF aufgefüllt, und die Neuronen verbleiben darin für die Messungen, da dieses Medium bei Raumtemperatur pH-Wert-stabil ist. Innerhalb der nachfolgenden 30 Minuten werden keine Experimente durchgeführt, da die Neuronen diese Zeit benötigen, um das veränderte Medium und die geringere Raumtemperatur von ungefähr 24°C zu adaptieren. Diese Ruhezeit gewährleistet ebenfalls, dass der restliche Farbstoff hydrolisiert wird.

Die Fluoreszenzaufnahmen werden mit einem Imaging-Mikroskop Axiovert 100TV (Zeiss) durchgeführt. Die Calcium-Signale werden dabei über einen Zeitraum von 120 Sekunden zur Detektion der spontanen Aktivität und 40 Sekunden zur Analyse der Stimulationsexperimente aufgenommen. Dabei wird pro Sekunde ein Bild mit einer CCD-Kamera aufgenommen, welches über 550 ms die Calcium-Fluoreszenz integriert. Die restliche Zeit (450 ms) wird für das Öffnen und Schließen des Shutters benötigt. Die Einzelaufnahmen, die die calcium-abhängigen Lichtintensitätsänderungen wiedergeben, werden mit Hilfe der Software Metamorph (Visitron Systems) als 12-bit-Graubilder gespeichert.

3.3.3. Stimulation der Neuronen

Für die Stimationsversuche werden Kulturschalen mit Neuronen verschiedenen Alters verwendet. Die Kulturschalen werden dazu auf einem speziell entwickelten Mikroskophalter befestigt (Abb. 3.15).

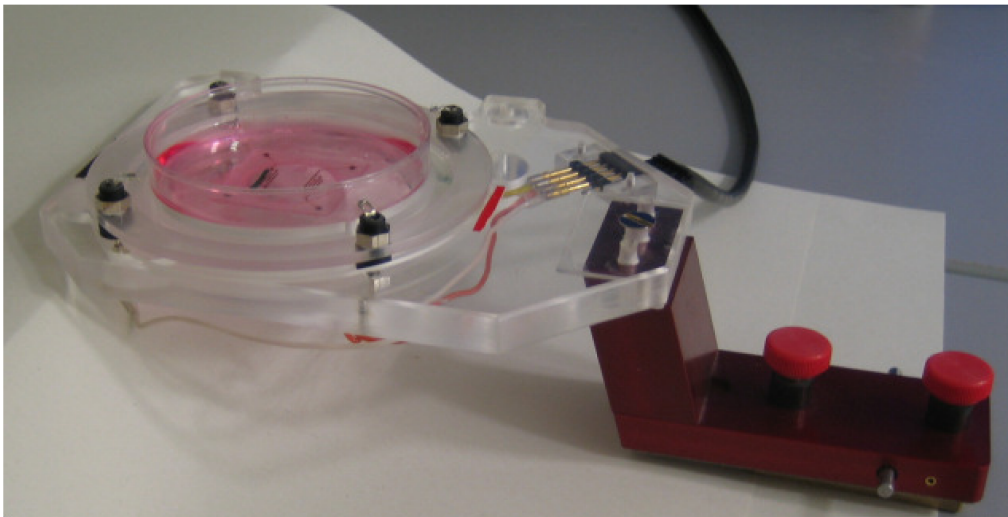


Abb. 3.15: Mikroskophalter mit Kulturschale und elektrischen Anschlüssen [Nörenberg, 2006]

An diesem Halter befinden sich elektrische Anschlüsse, so dass das elektrische Signal eingekoppelt werden kann. Durch Anlegen eines Testpulses mit einer geringen Amplitude von 500 mV wird überprüft, ob beide Stimulationselektrodenpaare richtig kontaktiert sind.

In jeder Kulturschale werden die Felder zufällig, aber unter dem Aspekt ausgewählt, dass die Neuronen gleichmäßig ohne Clusterbildung verteilt sind. Die untersuchten Felder befinden sich sowohl zwischen als auch außerhalb der Stimulationselektroden.

Vor Beginn der Stimulationsexperimente wird ein differentielles Interferenzkontrastbild (DIC) der zu untersuchenden Stelle aufgenommen. So ist die gesamte Zellanzahl und später die Anzahl spontan aktiver und stimulierter Neuronen bestimmbar. Anschließend wird zwei Minuten lang die spontane Aktivität im beobachteten Bereich mittels Ca^{2+} -Imaging detektiert. Dies dient zum einem als Kontrolle für die Aktivität der Kultur und zum anderen als Vergleichswert zur Anzahl stimulierter Neuronen. Nach der Aufnahme der spontanen Aktivität beginnen die Stimulationsexperimente. Dabei wird in einem Zeitintervall von 40 s in der 3. und in der 33. Sekunde ein Stimulationspuls angelegt. Ein Vergleich der Neuronenaktivität zu beiden Stimulationszeitpunkten ermöglicht das Trennen von spontaner und induzierter Aktivität. Eine erfolgreiche Stimulation regt sowohl in der 3. als auch in der 33. Sekunde Neuronen zum Feuern von Aktionspotentialen an. Spontane Aktivität hingegen ist nur zu einem Zeitpunkt beobachtbar. Nach Abschluss

3. Versuchsaufbau

der Stimulationsexperimente wird das untersuchte Gebiet mit einem Diamantschreiber von unten markiert, um es später, z.B. nach Zugabe von Inhibitoren, erneut zu untersuchen. In einer Kulturschale werden je nach Experiment und Güte des Netzwerkes bis zu acht Gebiete untersucht.

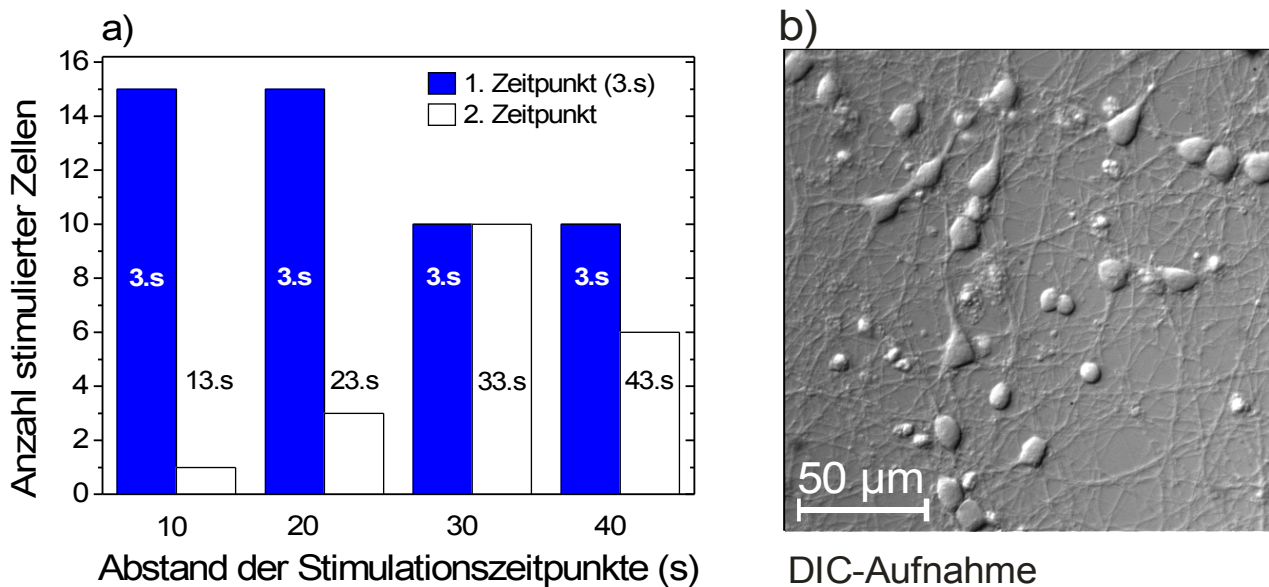


Abb. 3.16: a) Vergleich der angeregten Zellen in Abhängigkeit des Intervalls zwischen zwei Stimuli
b) DIC-Aufnahme des untersuchten Zellgebietes

Der zeitliche Abstand von 30 Sekunden zwischen zwei Stimulationen eines Experimentes basiert auf der Refraktärzeit des Neuronennetzwerkes. In Vorversuchen wurde der zeitliche Abstand zweier Stimuli variiert. Die erste Stimulation wird zum Zeitpunkt $t = 3$ s vorgenommen. Erfolgt die zweite Stimulation 10 oder 20 Sekunden nach der ersten, so können nur sehr wenige Neuronen erneut stimuliert werden (Abb. 3.16). Ein zeitlicher Abstand von 30 Sekunden oder mehr zwischen den elektrischen Reizen erhöht die Effizienz des zweiten Stimulationspulses. Es fällt auf, dass nach einer Erholungszeit von 40 Sekunden weniger Neuronen angeregt werden können als nach 30 Sekunden. Ursache hierfür ist die Zunahme der spontanen Aktivität des Netzwerkes und damit die nachfolgende Refraktärzeit einzelner Neuronen, die durch den elektrischen Puls nicht depolarisiert werden.

Nach Abschluss der Stimulationsexperimente werden die Neuronennetzwerke für spätere Untersuchungen fixiert. Dazu wird Paraformaldehyd (PFA) in die Kulturschale gegeben (Endkonzentration: 4%). Die Kulturschale verbleibt 30 Minuten bei 36°C im Inkubator und wird zum Entfernen der Fixierstoffe zweimal mit PBS gewaschen. Das Dehydrieren der Zellen erfolgt in Alkoholbädern mit steigenden Konzentrationen (50%, 70%, 80%, 95% und zweimal 100%) von jeweils fünf Minuten. In zwei Xylolbädern, mit einer Dauer von

jeweils fünf Minuten, werden die auf dem Deckgläschen befindlichen dehydrierten Zellen gereinigt, mit Fluormount eingebettet (BDH Laboratory Supplies) und auf Mikroskopträgern befestigt.

3.3.4. Auswertung der Ergebnisse

Für die Analysen werden die Anzahl der elektrisch stimulierten Neuronen, der spontan aktiven Zellen und die Gesamtzahl der Neuronen bestimmt. Die Gesamtanzahl der Neuronen wird durch das Markieren aller vorhandenen Zellen einer DIC-Aufnahme ermittelt. Zur Analyse der neuronalen Aktivität, spontan und induziert, werden die 12-bit-Graubilder verwendet. Dabei durchlaufen die Einzelaufnahmen ein Subtraktionsverfahren (Nachfolger minus Vorgänger), um die Grundfluoreszenz der Neuronen herauszufiltern und die Fluoreszenzänderungen aufgrund von Zellaktivität hervorzuheben. Zur Bestimmung der spontanen Aktivität werden der Zeitraum von 120 Sekunden auf Zellaktivität überprüft und die aktiven Zellen markiert (Abb. 3.17).

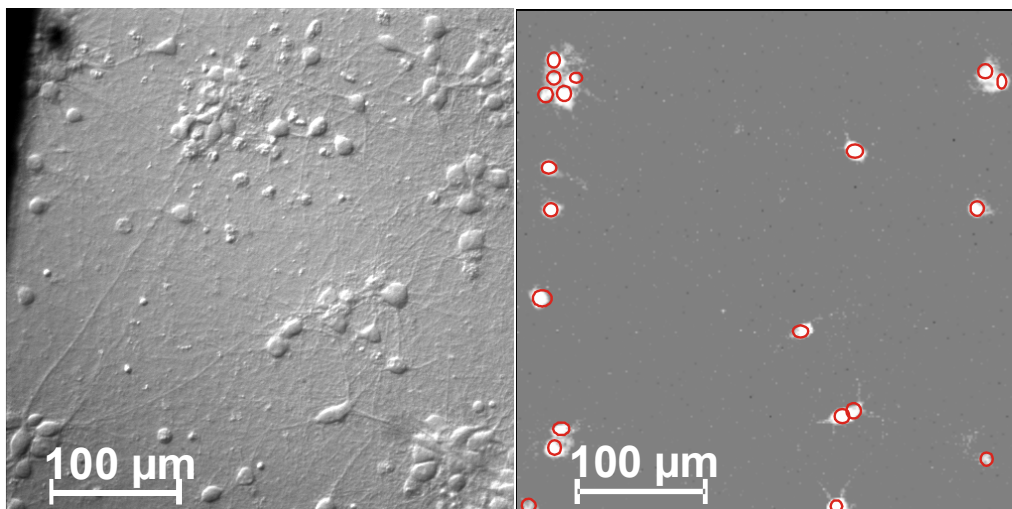


Abb. 3.17: DIC-Aufnahme eines Zellbereiches (links) und Aufnahme eines Graubildes (rechts), nach Subtraktion mit markierten aktiven Neuronen

3.4. Präparation der Hefezellen *Saccharomyces carlsbergensis*

Im folgenden Abschnitt werden die Gewinnung der Hefekulturen und der spezielle Messaufbau in Detail beschrieben und erklärt.

3.4.1. Hefezell- und Hefeextraktgewinnung

In Zusammenarbeit mit der Abteilung Biophysik, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, Institut für Experimentell Physik, wurden die Hefekulturen präpariert, wobei für die Gewinnung von Hefezellen ein Zeitraum von drei Tagen notwendig ist. Um Experimente an Hefeextrakt durchzuführen, ist ein Zeitspanne von vier Tagen anzusetzen [Warnke, 2003].

Am ersten Tag werden die Stammlösungen für das Nährmedium angesetzt. Im Anhang in Tabelle 8.4 finden sich die detaillierten Stoffe und Konzentrationen, aus denen sich die Stammlösungen zusammensetzen. Da auch Hefeextrakt im Medium enthalten ist, wird die Lösung als auch als halb-synthetisches Medium bezeichnet.

Ausgehend von den Stammlösungen wird das Nährmedium angesetzt (vgl. Tab. 8.5, Anhang). Alle Werte der Stoffmengen beziehen sich auf die geometrisch bedingte Reaktorfüllmenge von 9.1 Liter. Es wird zunächst der Hefeextrakt in destilliertem Wasser gelöst, und dann werden die anderen Substanzen dazu gegeben. Es muss dabei beachtet werden, dass das Salz B als letztes zugeführt wird, da sonst Fällungsreaktionen von Calciumphosphat auftreten. Das so gewonnene Gemisch wird mit destilliertem Wasser auf 4500 ml aufgefüllt und auf den pH-Wert 5.5 eingestellt. Im Fermenter wird das Medium erneut mit destilliertem Wasser bis auf ein Volumen von 8727 ml verdünnt und vermischt. Von diesem Medium werden 95.4 ml in einen 500 ml fassenden Schüttelkolben überführt. Diese Menge stellt die Vorkultur dar. Das im Fermenter verbliebene Medium bildet die Hauptkultur.

In den Fermenter wird vor Beginn der Rührprozedur 1 ml Antifoam Typ 289 (Sigma) gegeben. Dieser Zusatzstoff ist wichtig, da der sich sonst durch das Rühren und chemische Prozesse bildende Schaum den Wachstumsprozess der Hefezellen stört. Das Antischaummittel wird nur in sehr kleiner Konzentration verwendet, da diese oberflächenaktive Substanz nur geringfügig löslich ist und der Sauerstoff-Übergangskoeffizient verringert wird.

Als nächstes werden die Vorkultur für 15 Minuten und der Fermenter mit der Hauptkultur für 60 Minuten bei 120°C und 1.2 bar sterilisiert. Dann werden steril zu der Vorkultur Glukose (4 ml) und Vitamine (0.1 ml) sowie eine Impfkultur der Hefe *Saccharomyces carlsbergensis* gegeben. Die vorbereitete Vorkultur wird auf einen Schüttler gestellt und wächst bei 28°C und 170 U/min ca. 20 Stunden lang. Nach Ablauf der Zeit wird eine Zellzählung mittels Thoma-Kammer vorgenommen, da die Impfbedingungen der Hauptkultur mit einer konstanten Zellanzahl von $2.5 \cdot 10^5$ je ml erfolgen soll. Nach Bestimmung der Zellanzahl je Milliliter in der Vorkultur kann die notwendige Menge zum Impfen der Hauptkultur mit einer einfachen Verhältnisgleichung berechnet werden,

$$V_{VK} = \frac{V_{HK} \cdot Z_{Soll}}{Z_{VK}} \quad (3.1)$$

wobei V_{VK} dem Volumen der Vorkultur, die zugegeben werden muss, V_{HK} dem Volumen der Hauptkultur, Z_{Soll} der gewünschten Zelldichte und Z_{VK} der gemessenen Zelldichte der Vorkultur entsprechen. Die so berechnete Menge der Vorkultur, Glukose (360 ml) und Vitamine (9 ml) werden steril in den Fermenter gegeben und mit der Hauptkultur vermischt. Für 16 Stunden verbleibt die Hauptkultur im Fermenter bei 28°C, 550 U/min und einem Fluss von 600 l/h (Luft). Während dieser Zeit vermehren sich die Hefezellen nach den Wachstumskurven in Abb. 3.18.

Der Zeitpunkt der Ernte wird durch einen enzymatischen Glukosetest bestimmt. Es ist darauf zu achten, dass die bei der Ernte die Glukosekonzentration <0.1 mM beträgt. Dieser Zeitpunkt ist zu wählen, da so gute oszillatorische Eigenschaften der Hefe gewährleistet sind [Richard et al., 1993; Pye, 1968].

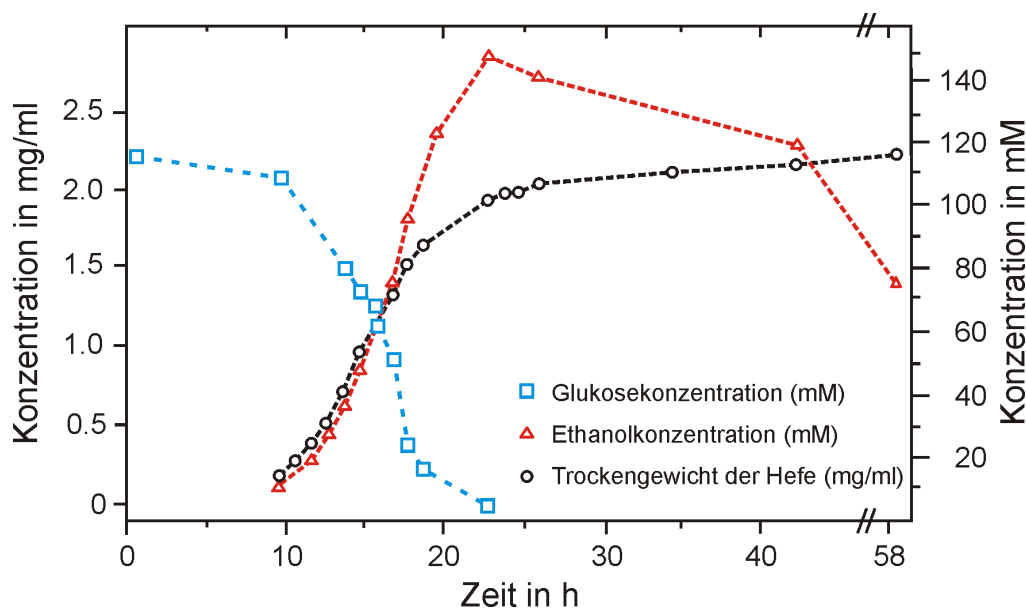


Abb. 3.18: Entwicklung der Hefezellen *Saccharomyces carlsbergensis* in einer Kultur bei 30°C, 2% Glukose [Mochan und Pye, 1973].

3. Versuchsaufbau

Bei der Weiterverarbeitung der Hefe ist genau auf eine Temperatur von 4°C zu achten, da eine zu warme Umgebungstemperatur zur Denaturierung der Enzyme führt. Dies bedeutet eine irreversible Veränderung der Enzymstruktur, die mit einem Verlust der biologischen Aktivität einhergeht. Ein weiterer Vorteil der geringen Temperatur ist die verminderte Aktivität der Proteasen, die Proteine – auch Enzyme der Glykolyse – abbauen [Dellweg et al., 1992; Schlegl, 1992]. Der Fermenter wird zur Zellgewinnung dreimal für sechs Minuten bei 5000 g zentrifugiert (Rotor JLA 8100). Nach dem ersten Zentrifugieren wird der sedimentierte Hefesatz in gekühltem (5°C), destilliertem Wasser resuspendiert. Im zweiten Zentrifugeschritt werden statt 6 nur noch 4 Zentrifugenbecher Wasser verwendet, da die Hefen dann weniger stark verdünnt werden. So diffundieren weniger Zellbestandteile aufgrund des unterschiedlichen osmotischen Druckes ins Zelläußere. Nach dem letzten Zentrifugieren ergibt sich eine Hefemasse mit einem Feuchtgewicht von 150-200 g je Präparation. Entsprechend der Menge der gewonnenen Hefezellen berechnet sich daraus das Volumen an MOPS-Puffer, in dem die Hefen gelöst werden. Von dem MOPS-Puffer, bestehend aus 25 mM KCl und 50 mM MOPSO (3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure), werden 10 ml Puffer auf 100 g Hefe gegeben, wobei diese Hefe-Lösung auf Eis zu lagern ist. In dem folgenden Ultraschallaufschluss werden in vier Zyklen die Zellwand und die Zellmembran der Hefezellen zerstört, um an die Metaboliten und das Zytoplasma zu gelangen. Dabei ist bei der Beschallung (Ultraschall Steuereinheit HD 2200, Bandelin Sonoplus, Spitze KE76) darauf zu achten, dass die Temperatur so gering wie möglich ist. Dies geschieht durch die Verwendung von Edelstahlbehältern für die Beschallung (Wärmeleitung), eine Kühlung der Hefen durch eine wässrige Kältemischung aus NaCl und Eis mit einer Temperatur von $T = -12^{\circ}\text{C}$ und einer Beschalldauer von 20 Minuten. Zudem wird der nächste Ultraschallzyklus erst begonnen, wenn die Hefetemperatur unter $T = 7^{\circ}\text{C}$ liegt. Nach Beendigung des Aufschlussprozesses wird die Hefesuspension in einen auf Eis gelagerten Erlenmeyerkolben überführt. Die nun folgenden Zentrifuge-Schritte trennen die störenden Zellbestandteile und die benötigten Enzyme voneinander (Tab. 3.4). Die Enzymfraktion wird abschließend noch einmal für eine Stunde bei 40000 U/min zentrifugiert (Rotor Ti 70), in geeignete Portionsgrößen aufgeteilt und zur späteren Verwendung eingefroren.

Von dem so gewonnenen Hefeextrakt kann auch die Metabolitenmenge und die Proteinkonzentration bestimmt werden [Warnke, 2003]. Da die Experimente mit einer konstanten Metaboliten- und Proteinkonzentration durchgeführt werden, wird nicht näher auf die Bestimmungsmethoden eingegangen.

Tab. 3.4: Zentrifugationsschritte zur Herstellung von Hefeextrakten. [Zentrifugeschritte 1-3 erfolgen mit der Zentrifuge Avanti J20 (Beckman) und Zentrifugeschritt 4 mit der Ultrazentrifuge Optima LE80K (Beckman) [Warnke, 2003]

Schritt	Zyklen	Dauer	Zentrifugieren mit	Rotor	Ziel
1	3	6 min	5000 g	JLA 8100	Gewinnung der Hefezellen
2	1	5 min	6000 g	JLA 16250	Trennung der nicht aufgeschlossenen Zellen
3	1	30 min	20000 g	JA 20	Sedimentation der Zellorganellen
4	2	60 min	40000 U/min	Ti 70	Fraktionierung von weißen Fetten, gelben Proteinen (Enzymen), bräunlichen Organellen, dunkelbraunen Mitochondrien. Erneute Zentrifugation der Enzyme, Entnahme des gelben Extraktes

3.4.2. Beschreibung des Versuchsplatzes

Mittels einer 300 W Xenon Lampe wird ultraviolettes Licht der Wellenlänge von 340 nm bereitgestellt und anschließend durch den optischen Versuchsaufbau geführt. Bei dem ultravioletten Filter $\lambda = 340$ nm handelt es sich um einen Breitbandfilter, da dieser eine hohe Transmission im Vergleich zu einem Bandpassfilter aufweist. Für den zweiten Filter $\lambda = 460$ nm wird ein Langpassfilter verwendet, da so auch relativ schwache Fluoreszenzsignale detektiert werden können. Dies ist erstrebenswert, da einzelne Metabolite, z.B. NADH, sehr empfindlich gegenüber UV-Licht sind und eine hohe Lichtintensität die Lebensdauer dieser Moleküle herabsetzt. Nach Durchlaufen der Linsen und Blenden trifft das Licht auf einen dichromatischen Spiegel und wird senkrecht nach unten auf die Probe gelenkt. Dieser Spiegel (Linos) zeichnet sich durch die einseitige dielektrische Beschichtung und einen Einfallswinkel von 45° aus. Darüber hinaus liegt sein Minimum der Transmission bei $\lambda = 358$ nm. Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda > 400$ nm kann den Spiegel passieren. In der Probe werden durch das auftreffenden UV-Licht NADH-Moleküle angeregt, die dann bei einer Wellenlänge von $\lambda = 460$ nm fluoreszieren [Lehninger et al., 1995]. Dieses Fluoreszenzlicht trifft nach dem dichromatischen Spiegel und Passieren des Langpassfilters auf eine CCD-Kamera und spiegelt die räumliche Verteilung des NADH in der Probe wider.

3. Versuchsaufbau

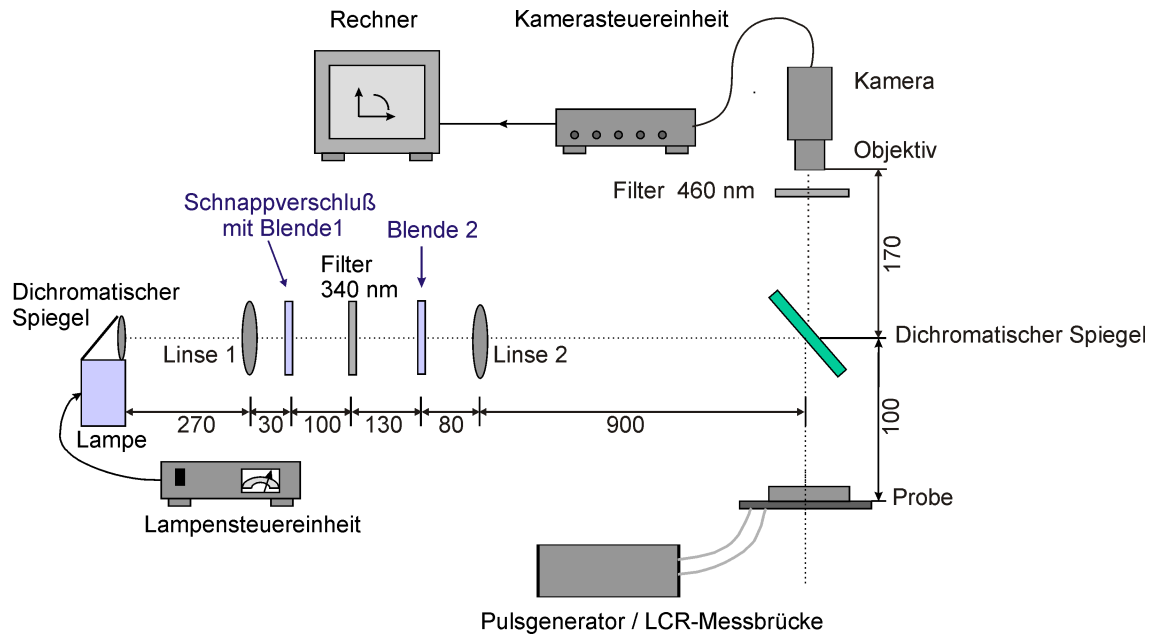


Abb. 3.19: Schematischer Versuchsaufbau zur Beobachtung des NADH-Signals [Warnke, 2003]

Für die Versuche mit Hefezellen und Hefeextrakt wird die Versuchskammer in Abb. 3.20 verwendet. Für jeden Versuch wird die Kammer neu vorbereitet. Dazu wird ein Teflonring ($\varnothing_{\text{innen}} = 15 \text{ mm}$, $\varnothing_{\text{außen}} = 22 \text{ mm}$, $h = 4 \text{ mm}$) mit Silikonpaste auf dem Boden des mit Elektroden bedampften Deckgläschens befestigt. Nach Abschluss dieser Vorbereitungen wird die Probenmischung mit einem Volumen von $V = 400 \text{ }\mu\text{l}$ in den Teflonring gegeben. Die befüllte Versuchskammer wird abschließend mit einem Menzelglas abgedeckt, um eine Verschmutzung durch Staubpartikel und ein Verdunsten des Nährmediums zu verringern.

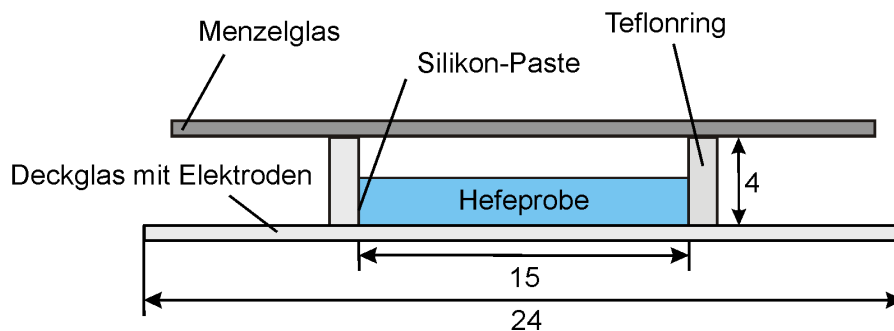


Abb. 3.20: Querschnitt durch die Versuchskammer (Skala in mm)

Mit Hilfe einer CCD-Kamera werden die Bilder aufgenommen. Bei allen Messungen wird die Verstärkerröhre auf einen festen Potentialwert eingestellt, um die Messungen vergleichbar auszuwerten. Durch einen Monitor und eine Videokarte (Frame-Grabber-Karte DT 302, Data Translation) werden die Experimente aufgezeichnet und digitalisiert. Die Graubilder der Kamera werden in dem zu untersuchenden Bereich $2 \times 2 \text{ mm}^2$ gemittelt, und es ergibt sich ein zeitlicher Intensitätsverlauf.

4. Charakterisierung von Elektroden, Elektrolyt und Zellen

In diesem Kapitel werden systematisch die physikalischen Eigenschaften der entwickelten Elektroden untersucht. Dabei stehen zunächst die elektrische Charakterisierung und die Anpassung der Metallelektroden an erforderliche Eigenschaften im Vordergrund. Nach der Materialauswahl und dem Festlegen des Elektrodenaufbaus ermöglichen Impedanzmessungen und -simulationen die Bestimmung des Frequenzverhaltens der Metallelektroden, der Elektroden im Elektrolyten und schließlich des gesamten Systems mit biologischen Strukturen (vgl. Abb. 4.1). Ein Ersatzschaltbild, das sukzessive aufgebaut wird, soll unter Berücksichtigung der elektrochemischen Doppelschicht Einflüsse einzelner Systemparameter herausstellen. Die experimentell bestimmte lokale Potentialverteilung im Elektrolyten nach Anlegen eines Pulses wird mit Simulationsrechnungen verglichen.

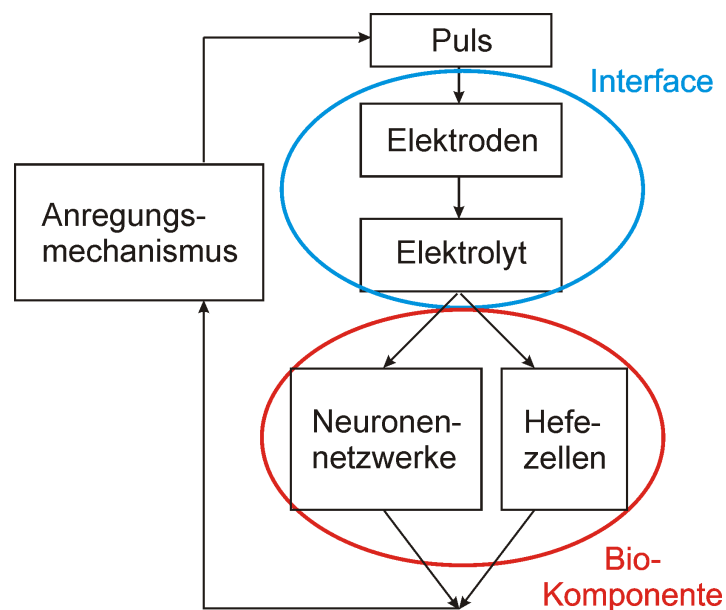


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Untersuchungsschwerpunkte

Die generelle Anwendung der Elektroden für Stimulationszwecke wird an zwei einfachen biologischen Systemen, Hefezellen und Neuronen, getestet. Die Bestimmung des Parameterfensters für eine erfolgreiche Anregung von Hefezellen und Neuronenkulturen erlaubt die Analyse von sofortiger Zellantwort und Langzeiteffekten. Abschließend soll die Untersuchung der spezifischen Anregungsmechanismen demonstrieren, dass die Elektroden für die Bearbeitung aktueller wissenschaftlicher Fragestellungen geeignet sind.

4.1. Überprüfung des Ausgangssignals

Der für alle Experimente verwendete Pulsgenerator 8010A der Firma Hewlett Packard besitzt eine Ausgangsimpedanz von $48\ \Omega$ auf [Hewlett Packard, 1993]. Das für die Stimulation definierte Rechtecksignal wird durch die Elektroden nur geringfügig verändert. Befindet sich die Elektrode im Medium, so fällt zeitabhängig ein Teil der Eingangsspannung über der Lösung bzw. der Grenzfläche ab. Dieser Verlust wird einerseits durch den ohmschen Widerstand des Elektrolyten bestimmt und andererseits durch Polarisations-effekte an der Grenzfläche Metallelektrode und Elektrolyt. Das gemessene Potential ähnelt daher dem Aufladungs- oder Entladungsvorgang eines R-C-Gliedes (Abb. 4.2).

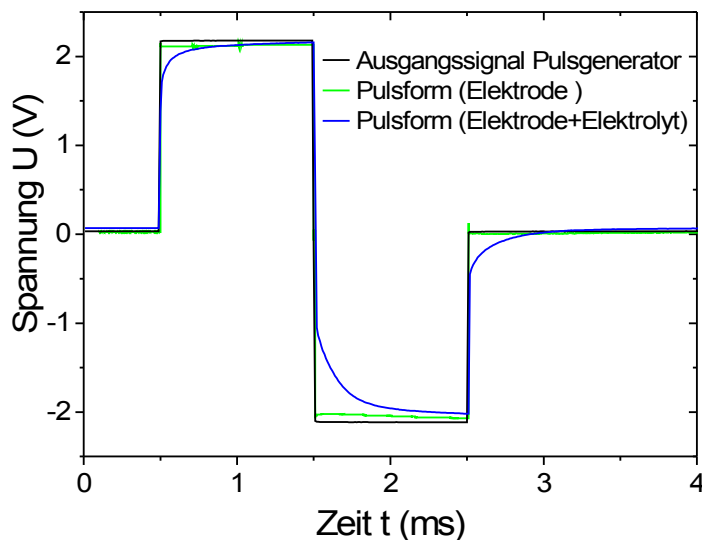


Abb. 4.2: Ausgangssignal des Pulsgenerators, Einfluss der Elektroden sowie Elektroden und Elektrolyt auf das Ausgangssignal

4.2. Die Stimulationselektroden

Die neuartige Stimulationselektrode soll einfach herzustellen sein. Daher werden die Elektroden mittels Elektronenstrahlverdampfen von bioverträglichen Metallen angefertigt. Optische und elektrische Messungen ermöglichen Aussagen über die spezifische Eigenschaften der entwickelten Elektrode. Die Messdaten aus I-U-Kennlinien und Impedanzspektren in Korrelation mit der Simulation der Impedanzspektren erlauben eine genaue elektrische Charakterisierung der Einzelparameter sowie das Frequenzverhaltens der Elektroden.

4.2.1. Materialwahl und Geometrie

Das Ziel meiner Arbeit ist es, einfach herzustellende Elektroden für die Stimulation von lebenden Organismen zu entwickeln, die eine preisgünstige und vielseitig anwendbare Alternative zu den bereits erhältlichen Elektroden bietet. Die Metalle, die später als Elektrodenmaterial verwendet werden, müssen generell eine hohe Korrosionsbeständigkeit gegenüber den gelösten Salzen des Zellmediums (Elektrolyten) aufweisen, besonders jedoch während eines Stromflusses [Navarro et al., 2005], und eine geringe Impedanz besitzen [Stieglitz und Meyer, 1998].

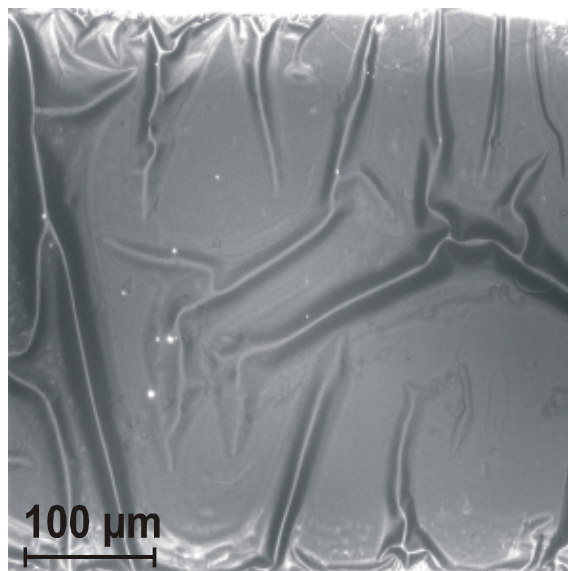


Abb. 4.3: Faltenbildung in einer 200 nm dicken, gesputterten Platin-Schicht nach der Neuronenplattierung

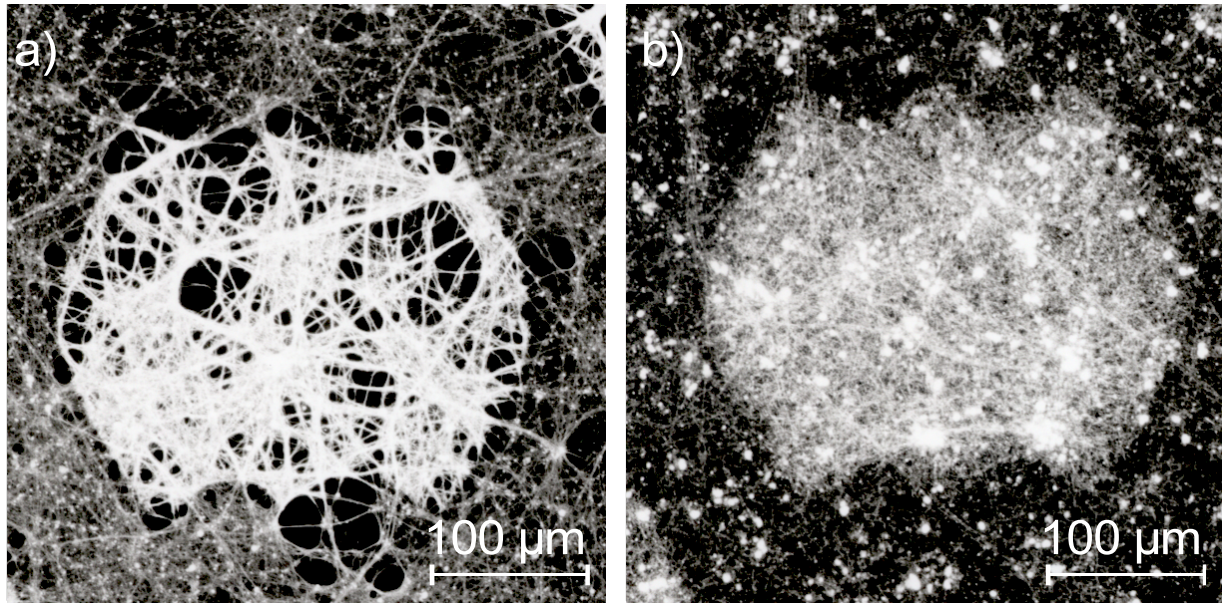


Abb. 4.4: Vergleich der Netzwerke a) ohne Nickel-Haftschrift, b) mit Nickel-Haftschrift (50 nm) auf einer Platin-Teststruktur (200 nm), wobei die Metallschichten heller erscheinen (Mitte) als die umgebenden Glasbereiche.

Gold und Platin werden beispielsweise als bioverträgliche Materialien vorgeschlagen, die einen ohmschen Kontakt zum Zellgewebe ausbilden [Geddes und Roeder, 2001; Geddes und Roeder, 2003]. Eine einfache und schnelle Depositionsart Metallschichten abzuscheiden ist das Sputtern, weshalb diese Methode anfänglich verwendet wird. Als Targetmaterial steht nur Platin zur Verfügung. Daher wird eine 200 nm dünne Platin-Schicht mittels dieser Methode auf die Deckgläschen aufgebracht. Nach dem Plattieren der Neuronen kommt es jedoch zu einer Faltenbildung der Platinschicht (Abb. 4.3).

Eine wellenfreie Oberfläche ist jedoch notwendig, um das Auswachsen eines unfaszikulierten, homogenen Netzwerkes (Abb. 4.4 b)) zu gewährleisten. Durch die Verwendung einer zusätzlichen 50 nm dünnen Nickel-Haftschrift lässt sich die Faltenbildung vermeiden. Dadurch bildet sich sowohl auf den glatten Metallelektroden als auch auf den unbedeckten Glasflächen das Netzwerk nahezu homogen aus (Abb. 4.4 b)). Das homogene Auswachsen wird durch die Verwendung einer 50 nm dünnen Nickel-Haftschrift gewährleistet.

Um jedoch die für die mikroskopischen Analysen mindestens notwendige Transmissions-eigenschaften der Metallelektroden von $T = 0.05$ sicherzustellen, darf die Schichtdicke der Elektroden höchstens 55 nm betragen [Günther, 2003]. Bei ausführlichen Versuchsreihen stellte sich heraus, dass die Reproduzierbarkeit der Sputterdeposition gezielte Schichten dieser Dicke nicht gewährleisten kann. Daher werden die Elektroden mittels Elektronenstrahlverdampfen hergestellt. Aufgrund der thermischen Eigenschaften von Platin wird Gold als alternatives, bioverträgliches Elektrodenmaterial gewählt. Eine größtmögliche

Transmission von $T = 0.07$ bei geschlossener, leitender Metallschicht wird reproduzierbar mit einer 5 nm dünnen Nickel-Haftschrift gefolgt von einer 50 nm dünnen Goldschicht mittels Elektronenstrahlverdampfen erreicht.

Mit dem optimierten Aufbau der Elektrodenstruktur soll nun eine Stimulation erfolgen. Dabei tritt während der ersten Stimulationsversuche mit biphasigen Pulsen einer Amplitude von 3 V eine elektrolytische Zersetzung der Nickel-Schicht auf [Günther, 2003; Opitz, 2003]. Ursache hierfür ist das dicht bei Null liegende Standardpotential $E_0 = -0.23$ V von Nickel [Formeln und Tabellen, 1994], welches die Redoxreaktion von Nickel ($\text{Ni} \leftrightarrow \text{Ni}^{2+} + 2e^-$) begünstigt, was zum Ablösen der Goldelektroden führt. Die dann in der Lösung vorliegenden Nickel-Ionen wirken toxisch auf biologisches Gewebe [Diwan et al., 1992]. Aus diesen Gründen muss ein anderes Haftschriftmaterial verwendet werden. Da Titan eine sehr korrosionsbeständige Oxidschicht ausbildet [Cotton und Hanson, 1994], die in chlorid-haltigen Umgebungen (Zellmedien) bis über 10 V stabil bleibt [Dugdale und Cotton, 1964], wird dieses Material für die Haftschrift getestet.

Die Verwendung einer Ti- anstatt einer Ni-Haftschrift zeigt dabei keine für die Versuchsanforderungen relevante Änderung der elektrischen Eigenschaften der Elektroden, was durch I-U-Kennlinien und eingehende Impedanzmessungen nachgewiesen ist [Günther, 2003]. Die Transmission wird durch den Austausch der Haftschriften sogar noch erhöht ($T_{\text{Ti}} = 0.12$), wodurch das mikroskopische Arbeiten erleichtert wird. Die auftretenden Abweichungen für den Bahnwiderstand R_B aufgrund der Änderung des Haftschriftmaterials liegen innerhalb der Variation für Elektrodenstrukturen mit gleicher Haftschrift.

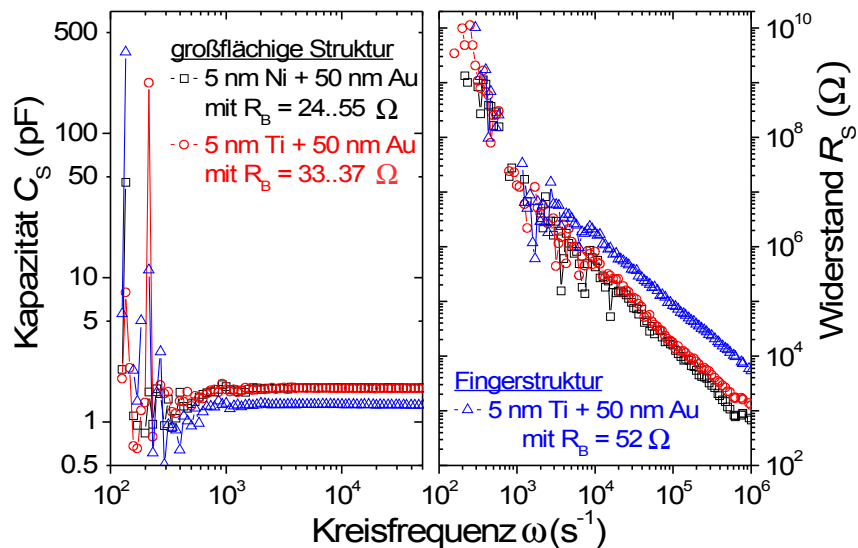


Abb. 4.5: Vergleich der Impedanzmessungen von großflächigen Elektroden mit unterschiedlichen Haftschriften (Nickel bzw. Titan) und der Fingerstruktur (Titan-Haftschrift)

$$E = \frac{U}{d} \quad (4.1)$$

In den Impedanzmessungen ist eine Unterscheidung der Elektrodenstrukturen aufgrund der veränderten Haftschrift nicht möglich, da die Kapazität und der Widerstand von nominell gleichen Strukturen um den Faktor zwei bis drei variieren kann [Günther, 2003]. Es muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass die Elektrodenstruktur aus Abb. 3.3 a) nicht zur Stimulation von Neuronen geeignet ist. Der Grund hierfür ist der Elektrodenabstand von 1 mm, wodurch die benötigte Feldstärke zur Anregung nicht ohne elektrolytische Effekte erzeugt werden kann. Nach Gl. (4.1) wird bei gleicher angelegter Spannung mit einem verringerten Elektrodenabstand von 300 µm ungefähr die dreifache Feldstärke erreicht. Die Verwendung von zwei ineinandergreifenden Elektroden mit einem Abstand von 300 µm (vgl. Abb. 3.3 b)) sichert zum einen eine höhere Feldstärke. Darüber hinaus weist diese Struktur eine größere Varianz der Feldverteilung auf, was eine vielseitige Analyse der Anregungsbedingungen ermöglicht.

Die veränderte Geometrie der Elektrode spiegelt sich jedoch nicht signifikant in den I-U-Kennlinien oder den Impedanzmessungen (Abb. 4.5) wider.

4.2.2. Beschreibung der Elektrodenstruktur durch ein Ersatzschaltbild

Für die Modellierung des Gesamtsystems durch ein Ersatzschaltbild müssen sukzessive die Einzelkomponenten bestimmt werden. Die Impedanzmessungen der Fingerstrukturen bilden daher die Grundlage für das Verständnis der späteren Wechselwirkungen. Eine Variation der Einzelparameter erfolgt solange, bis eine Übereinstimmung von Messwerten und Simulation erreicht ist.

$$Z = R_s + \frac{1}{i\omega C_s} \quad (4.2)$$

Die Motivation der Wahl der Ersatzschaltbilder erfolgt nach Abb. 4.6, wobei nicht zwischen großflächiger Elektrodengeometrie und Fingerstruktur unterschieden wird, da die Unterschiede in den Impedanzmessungen zu gering sind (vgl. Abb. 4.5).

Das *Ersatzschaltbild 1* enthält den Widerstand der Leiterbahnen R_B , den Widerstand R_1 und die Kapazität C_1 zwischen den Elektroden und darüber hinaus eine Streukapazität C_2 (vgl. Abb. 4.6).

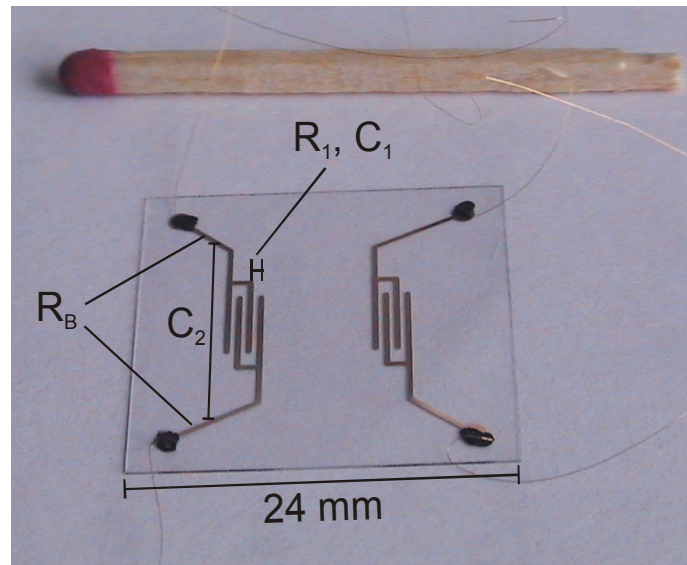


Abb. 4.6: Photo der Elektrodenstruktur mit gekennzeichneten Parameter des Ersatzschaltbildes

Die Aufstellung der Einzelkomponenten innerhalb des Ersatzschaltbildes erfolgt durch die Analyse der möglichen Strompfade. Aufgrund des Messaufbaus und des Aufbaus der Elektroden ergibt sich ein Verschiebungsstrom über die Streukapazität und über die Impedanz der Elektrode, was zu einer Parallelschaltung führt. In dem Ersatzschaltbild werden die Kapazität C_1 und der Widerstand R_1 als Parallelschaltung festgelegt und der Bahnwiderstand R_B in Reihe dazu angenommen (vgl. Abb. 4.7).

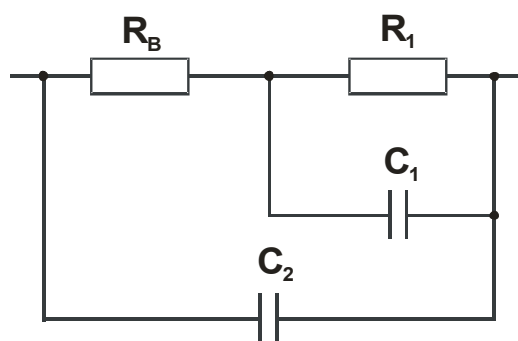


Abb. 4.7: Ersatzschaltbild 1 der Elektrodenstruktur, R_B -Widerstand der Leiterbahnen, R_1 -Widerstand zwischen den Elektroden, C_1 -Kapazität zwischen den Elektroden, C_2 Streukapazität

Mit diesem Schaltbild ist es möglich, die Impedanz der Elektrodenstruktur über mehrere Zehnerpotenzen hinweg zu beschreiben (Abb. 4.8). Dabei werden für die einzelnen Parameter folgende Werte definiert:

$$R_B = 80 \, \Omega$$

$$R_1 = 3 \, \text{G}\Omega$$

$$C_1 = 0.249 \, \text{pF}$$

$$C_2 = 0.7 \, \text{pF}$$

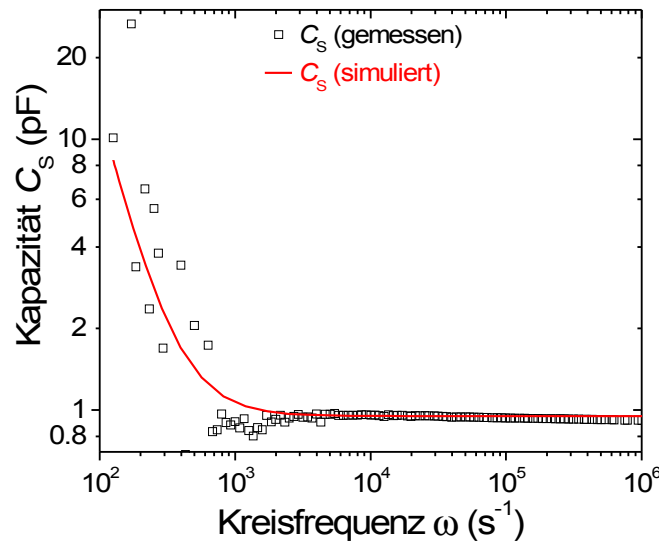


Abb. 4.8: Simulation der Impedanzmessung mit dem Ersatzschaltbild 1, [Günther, 2003]

Eine Vergrößerung der Komplexität des Ersatzschaltbildes in Abb. 4.7 führt durch die Einführung eines zusätzlichen Streuwiderstandes oder einer Induktivität der Leiterbahnen zu keiner signifikant verbesserten Simulation der Messwerte [Günther, 2003].

Aus den Simulationen ergibt sich ein Wert von 80Ω für den Bahnwiderstand, der etwa zweimal dem durch I-U-Kennlinien an Einzelfingern bestimmten Wert des Widerstandes von 33Ω bzw. 45Ω entspricht (vgl. Abb. 4.5). Der Glaswiderstand zwischen den Elektroden wird mit Hilfe einer Direktmessung, mit dem Messgerät Advantest R8340A, bestimmt und liefert für R_1 einen Wert von $10 G\Omega$ [Günther, 2003]. Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie der für die Simulationen verwendete Widerstand R_1 mit $3 G\Omega$. Die Streugrößen in den erweiterten Ersatzschaltbildern werden durch Impedanzmessungen ohne Probe durchgeführt und entsprechen den simulierten Werten.

4.3. Die Wechselwirkung von Elektroden und Elektrolyt

An die Analyse der Metallelektroden schließt sich die Charakterisierung des Elektrolyten an. Untersuchungen der Zellmedien hinsichtlich ihres Verhaltens während des Anlegens von Gleich- und Wechselspannung grenzen den Stimulationsbereich und die Pulsform ein, die für Stimulationszwecke ohne das Auftreten von elektrolytischen Effekten verwendet werden können. Anschließend erfolgt die Charakterisierung der Elektroden, die sich im Zellmedium befinden. Nach einer Bestimmung der Charakteristika der Einzelkomponenten können die auftretenden Wechselwirkungen interpretiert werden. Eine Modellierung des Frequenzverhaltens des Gesamtsystems ist nur möglich, wenn die elektrochemische Doppelschicht im Ersatzschaltbild berücksichtigt wird.

4.3.1. Charakterisierung des Elektrolyten

In diesem Kapitel werden die elektrischen Eigenschaften der Elektrolyten untersucht, die bei der Stimulation das Überleben der Hefezellen und Neuronen sicherstellen. Dabei ist der Elektrolyt KH_2PO_4 das Medium der Hefezellen und aCSF bzw. DMEM (CO_2 -gepuffert) sind die Nährmedien der Neuronen für Versuche unter atmosphärischen Bedingungen bzw. im Inkubator (5% CO_2). Bei den Stimulationsexperimenten werden Rechteckpulse angelegt, deren Einfluss auf den Elektrolyten analysiert wird (Abb. 4.9). Um Ladungsakkumulationen und damit verbundene elektrolytische Effekte und Zellschäden zu vermeiden, werden ausschließlich biphasige Rechteckpulse für die Stimulation verwendet (Abb. 4.9).

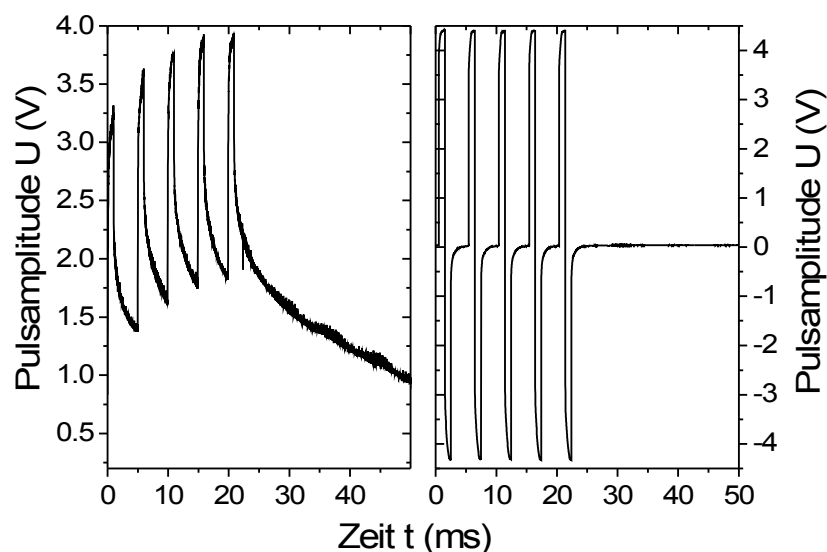


Abb. 4.9: Vergleich von monophasigen Pulsen mit Ladungsakkumulation (links) und biphasigen Pulsen (rechts)

4. Charakterisierung von Elektroden, Elektrolyt und Zellen

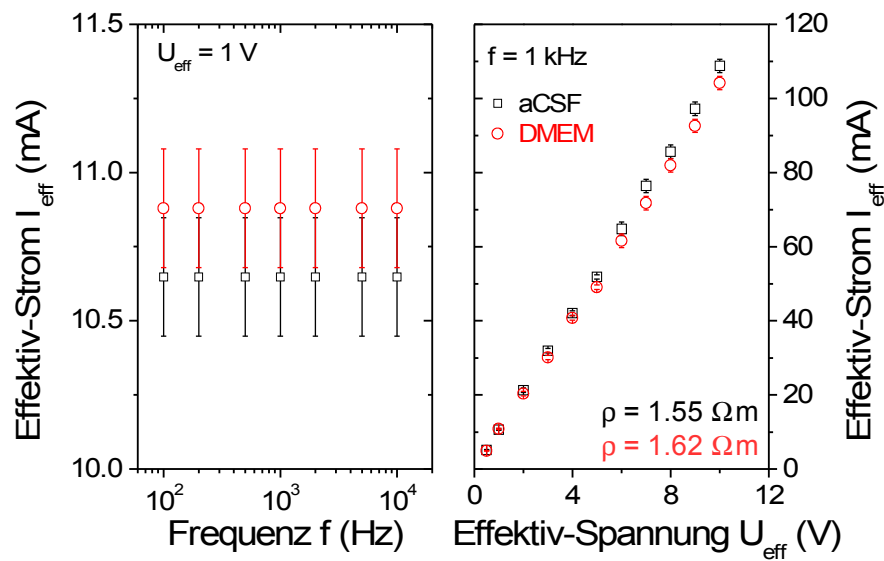


Abb. 4.10: Stromabhängigkeit von zwei Elektrolytlösungen von der angelegten Frequenz und Spannung [Günther, 2003]

Die frequenzabhängigen Untersuchungen bei einer konstanten Spannungsamplitude ergeben für beide Elektrolyten, aCSF und DMEM, einen konstanten und damit frequenz-unabhängigen Wert des Effektivstroms (Abb. 4.10). Die Abhängigkeit des Effektivstroms von der angelegten Effektivspannung lässt sich für beide Elektrolyten bei 1 kHz sehr gut durch ein ohmsches Verhalten annähern. Als vernachlässigbarer Unterschied der Lösungen kann nur der leicht höhere Widerstand der DMEM-Lösung genannt werden (Abb. 4.10).

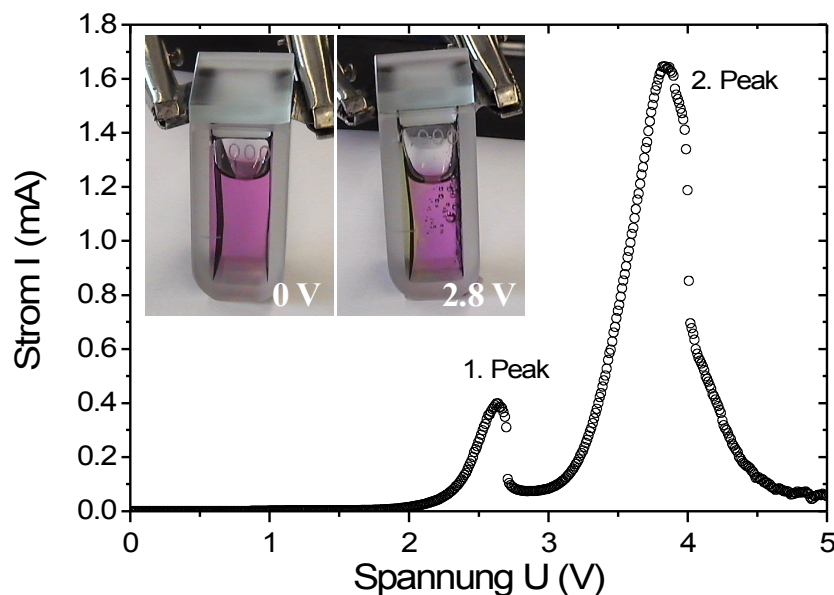


Abb. 4.11: I-U-Kennlinie der Elektrodenstruktur mit Elektrolyt aCSF und Auftreten von Elektrolyse, Photo der Elektrolyse von DMEM bei 2.8 V in einer Küvette mit Wolfram-Elektroden [Günther, 2003]

Die I-U-Kennlinie einer mit aCSF bedeckten Elektrodenstruktur zeigt deutlich, dass sich an die Zersetzung von aCSF die Elektrolyse der Metallelektroden anschließt (Abb. 4.11). Bei einer Gleichspannung von ca. 2.6 V kommt es zu einer Bildung von Gasbläschen, welches elektrisch mit dem Auftreten des ersten Peaks in Abb. 4.11 identisch ist. Bei einer weiteren Erhöhung der Spannung lösen sich die Metallelektroden auf. Ein äquivalentes Verhalten wird auch bei dem Elektrolyten DMEM in einer Küvette mit Wolfram-Elektroden aufgrund gleicher elektrischer Eigenschaften festgestellt. Die erste Stromspitze ist dabei mit der Elektrolyse des DMEMs korreliert, was die Photos in Abb. 4.11 bestätigen.

Da für Stimulationszwecke nur biphasige Pulse verwendet werden, treten bis ± 2.5 V keine messbaren Elektrolyse-Effekte auf. Erst nach der Erhöhung der Pulsamplitude eines biphasigen Doppelpulses auf ± 6 V kann eine elektrolytische Zersetzung des Mediums aCSF (Abb. 4.12) nachgewiesen werden (vgl. im Anhang Abb. 8.1).



Abb. 4.12: DIC-Aufnahme von Elektrolyse-Effekten bei Anlegen eines biphasigen Doppelpulses an einer Fingerelektrode mit einer Amplitude von ± 6 V

Da das Frequenzverhalten von Elektroden mit Elektrolyt starke Unterschiede zu den Impedanzmessungen nur an den Elektroden aufweist [Günther, 2003], muss das Ersatzschaltbild um eine frequenzabhängige Komponente erweitert werden.

4.3.2. Die elektrochemische Doppelschicht

Da bei jedem Kontakt von Metalloberfläche und Elektrolyt eine elektrochemische Doppelschicht entsteht, muss diese bei der elektrischen Beschreibung und Charakterisierung des Elektrodenarrays mit Elektrolyt berücksichtigt werden. Unter der Voraussetzung, dass keine Elektrolyse stattfindet, fließt bei Anlegen einer Gleichspannung an die Elektroden kein Strom über die Doppelschicht. Da aber die Doppelschicht mit der Frequenz einer angelegten Wechselspannung umgeladen wird, fließt ein Strom, ohne dass Ladungsträger die Phasengrenze Metall-Elektrolyt durchdringen. Daher kann die Doppelschicht durch eine Parallelschaltung von einem frequenzabhängigem Widerstand und einer frequenzab-

4. Charakterisierung von Elektroden, Elektrolyt und Zellen

hängigen Kapazität beschrieben werden [Hamann und Vielstich, 1998; Green et al., 2002]. Dabei ist in [Green et al., 2002] die Formel für die frequenzabhängige Doppelschicht mit Gl. (4.3) angegeben.

$$Z_{\text{DS}} = \frac{A}{(i\omega)^\beta} = \frac{A}{\omega^\beta} \left[\cos\left(\frac{\pi}{2}\beta\right) - i \cos\left(\frac{\pi}{2}\beta\right) \right] \quad (4.3)$$

Die Parameter A und β charakterisieren die Doppelschicht, wobei A die Stärke der Einkopplung beeinflusst und β die Frequenzabhängigkeit moduliert. Beide Parameter beeinflussen das elektrische Verhalten der Doppelschicht, welches stärker ohmsch oder kapazitiv sein kann. Ein kleiner Wert des Parameters A symbolisiert eine schwach ausgeprägte Doppelschicht mit eher kapazitivem Verhalten, ein großer Wert des Parameters A repräsentiert hingegen einen starken Einfluss der Doppelschicht mit dem damit verbundenen eher ohmschen Verhalten. Der Parameter β variiert zwischen den Werten 0 und 1. Dabei bedeutet ein kleiner Wert eine mehr ohmsche Doppelschicht ohne starke Frequenzabhängigkeit und ein Wert nahe 1 eine starke Frequenzabhängigkeit der eher kapazitiven Doppelschicht.

Eine Integration der elektrochemischen Doppelschicht in das Ersatzschaltbild erfolgt über die Betrachtung der Strompfade, bei spannungsführenden Elektroden. Der Strom fließt durch die Zuleitungen bzw. die Elektroden selbst, über die Impedanz der elektrochemischen Doppelschicht und als Verschiebungs- oder Ionenstrom durch den Elektrolyten. Aus diesem Stromweg ergibt sich eine Parallelschaltung von Kapazität und Widerstand des Elektrolyten. In Reihe dazu sind die Impedanzen der Leiterbahnen und der Doppelschicht zu setzen. Aus diesen Überlegungen resultiert das *Ersatzschaltbild 2* in Abb. 4.13.

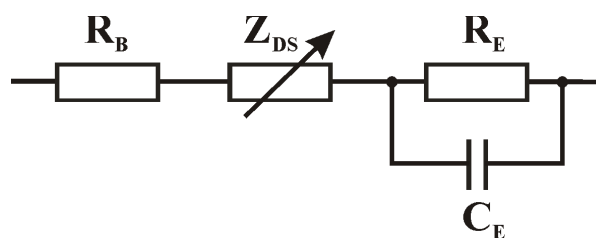


Abb. 4.13: Ersatzschaltbild 2 mit Bahnwiderstand R_B , elektrochemischer Doppelschicht Z_{DS} und Elektrolytwiderstand R_E und Elektrolytkapazität C_E [Günther, 2004]

Die im Vorfeld durch Messungen bestimmbaren Größen, Elektrolytwiderstand und Bahnwiderstand, werden bei der Simulation als Startwerte vorgegeben (Details in [Günther, 2004]). Das Frequenzverhalten des Systems kann unter Berücksichtigung des *Ersatzschaltbildes 2* in hoher Übereinstimmung simuliert werden (Abb. 4.14). Das bedeutet, dass die sich ausbildende elektrochemische Doppelschicht das elektrische Verhalten maß-

geblich beeinflusst, so dass aus dem *Ersatzschaltbild 1* nur noch der Bahnwiderstand eine Relevanz besitzt.

Für die Simulation mit dem *Ersatzschaltbild 2* werden folgende Werte für die Einzelparameter gewählt:

$$R_B = 70 \, \Omega \quad A = 6369 \quad \beta = 0.48 \quad R_E = 167 \, \text{k}\Omega \quad C_E = 1.11 \, \mu\text{F}$$

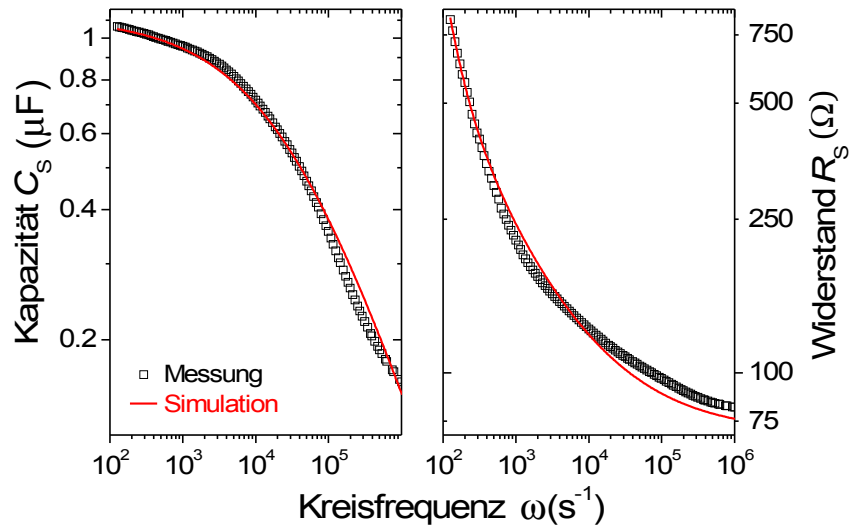


Abb. 4.14: Vergleich von Impedanzmessung an Fingerstrukturen mit aCSF und der Simulation nach Ersatzschaltbild 2 [Günther, 2004]

Da die elektrochemische Doppelschicht für eine angepasste Simulation der Messwerte zwingend erforderlich ist, wird kurz der Einfluss der Parameter A und β auf das Gesamtverhalten analysiert. Der Parameter A allein beeinflusst die Impedanz nur sehr schwach, kann jedoch in Kombination mit β die Krümmung variieren. Änderungen der anderen Parameter ziehen keinerlei signifikante Auswirkung nach sich, ausgenommen der Einfluss des Elektrolytwiderstandes R_E und der -kapazität C_E bei geringen Frequenzen und des Bahnwiderstandes R_B bei hohen Frequenzen [Günther, 2004].

Trotz der guten Simulationsergebnisse der Impedanzverläufe für die Elektrolytlösungen der Nervenzellen ist das aufgestellte *Ersatzschaltbild 2* nicht für die elektrische Beschreibung der Phosphat-Lösung geeignet (vgl. Abb. 4.15). Grund dafür sind wahrscheinlich die verschiedenen Ionenradien, die zur Ausbildung von sehr unterschiedlichen elektrochemischen Doppelschichten auf den entgegengesetzt geladenen Elektroden führen. Eine deutlich verbesserte Simulation kann durch die Berücksichtigung einer weiteren Doppelschichtimpedanz im Ersatzschaltbild erreicht werden. Eine zusätzliche Doppelschicht erlaubt eine genauere Charakterisierung der Systemimpedanz. Da sich die physikalischen Vorgänge an einer bzw. mehreren Grenzschichten jedoch ähneln, wird auf eine zeitaufwendige Erweiterung der Simulation verzichtet.

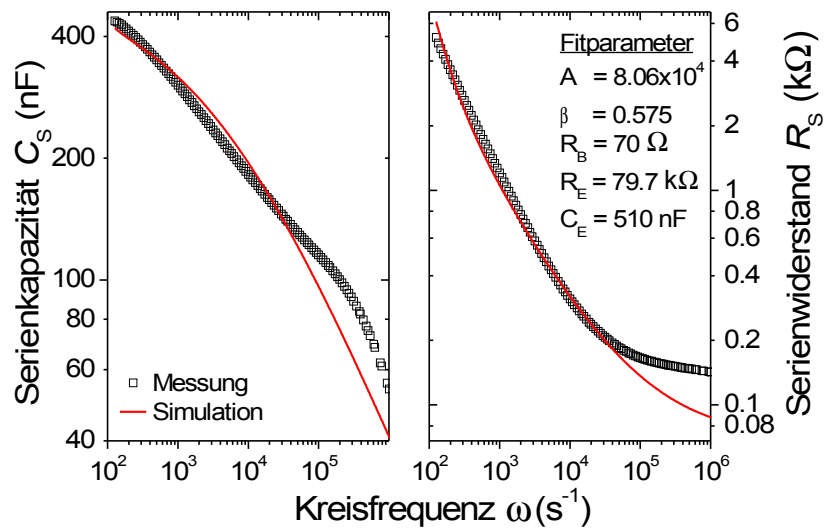


Abb. 4.15: Vergleich von Impedanzmessung an Fingerstrukturen mit KH_2PO_4 und der Simulation nach Ersatzschaltbild 2 [Günther, 2004]

4.3.3. Charakterisierung von Elektrodenarray und Elektrolyt

Um auftretende Dispersionen besser analysieren zu können, werden nachfolgend die Impedanzen des Systems im Nyquistplot dargestellt. Der Einfluss der frequenzabhängigen Doppelschicht auf die Gesamtimpedanz ist in Abb. 4.16 dargestellt, wobei die Parameter

$$R_B = 70 \, \Omega \quad R_E = 250 \, \text{k}\Omega \quad C_E = 600 \, \text{nF} \quad A = 4 \cdot 10^4 \quad \beta = 0.65$$

für die Simulation verwendet werden.

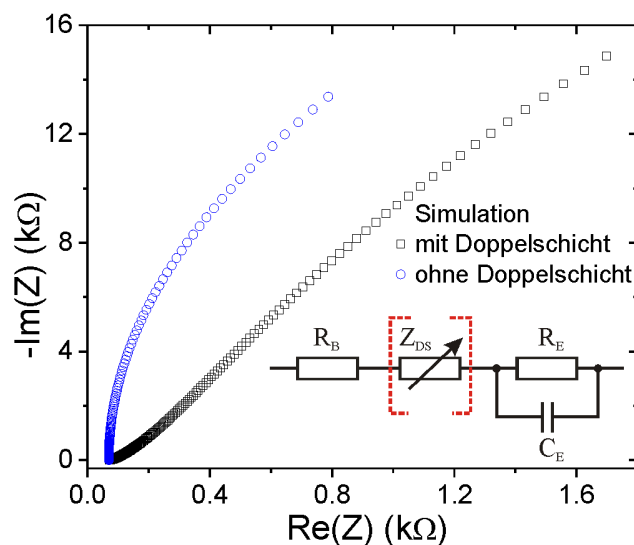


Abb. 4.16: Vergleich der simulierten Impedanzkurven im Nyquistplot für ein Ersatzschaltbild mit und ohne Doppelschicht [Günther, 2004]

Aufgrund des eingeschränkten Messbereichs von 20 Hz bis 1 MHz kann die Grenzfrequenz des Systems nicht bestimmt werden.

Im Folgenden werden Impedanzmessungen an Fingerelektroden mit verschiedenen Elektrolyten durchgeführt, um den Einfluss der elektrolyt-abhängigen Doppelschicht auf die Gesamtimpedanz zu analysieren. Da die beiden Elektrolyten aCSF und DMEM elektrisch nicht zu unterscheiden sind (vgl. Abb. 4.10), wird im Anschluss aCSF mit dem Phosphatpuffer der Hefezellen verglichen. Dabei weist DMEM eine höhere Kapazität als KH_2PO_4 auf (Abb. 4.17).

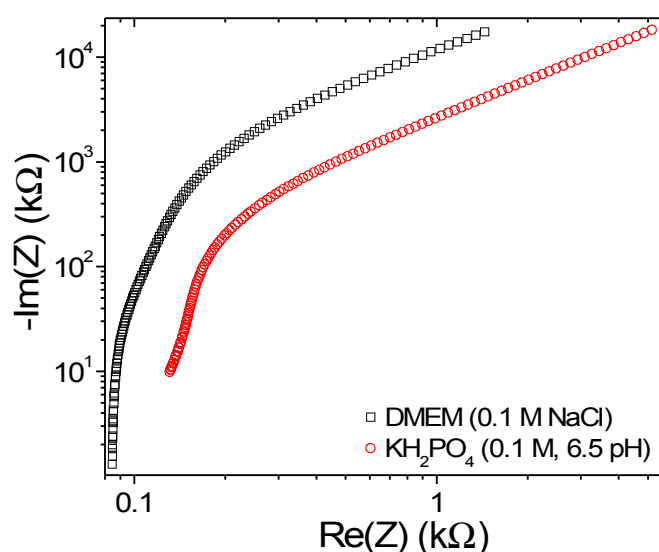


Abb. 4.17: Nyquistplot der Impedanz von Elektroden und Elektrolyt in Abhängigkeit von DMEM und KH_2PO_4 [Günther, 2004]

Eine Veränderung der Molarität des Elektrolyten beeinflusst die Dielektrizitätskonstante und die Doppelschicht des Gesamtsystems. Aufgrund der sensiblen Ionenkonzentrationsbedingten Diffusions- und Stoffwechselprozesse von Neuronen kann der Einfluss der Molarität auf die Impedanz nur mit Hilfe des Phosphatpuffers analysiert werden. Dies ist unproblematisch, da Hefezellen in Elektrolyten mit verschiedenen Molaritäten bzw. pH-Werten überlebensfähig sind [Asami und Yonezawa, 1996]. Mit steigender Molarität sollten die Dielektrizitätskonstante und die Systemkapazität abnehmen [Chowdhuri und Chandra, 2001], was Impedanzmessungen jedoch nicht bestätigen (Abb. 4.18 a)). Bei der Analyse des Nyquistplots ist der zu kleinen Imaginärteilen hin verschobene Kurvenverlauf der 1 molaren KH_2PO_4 -Lösung auffällig, der auf einen stark kapazitiven Anteil der Doppelschicht schließen lässt. Das dominierende kapazitive Verhalten resultiert aus dem veränderten Aufbau der Doppelschicht von 1 molaren Lösungen. Die Doppelschicht besteht hier nämlich nur noch aus der starren Komponente; die diffuse Doppelschicht fehlt

4. Charakterisierung von Elektroden, Elektrolyt und Zellen

[Schmickler und Henderson, 1996; Hamann und Vielstich, 1998]. Die mögliche Erklärung, dass die Ladungsträger näher an die Elektroden gelangen und die Kapazität erhöhen, steht dabei im Widerspruch zu dem Ergebnis der Impedanzmessung. Eine Erklärung für Plausibel erscheint jedoch, dass der Widerstand aufgrund des Fehlens der beweglichen Ladungsträger größer wird.

Da Hefezellmedien hinsichtlich ihres pH-Wertes variieren können [Asami und Yonezawa, 1996], wird der Einfluss der Hydronium-Ionen auf die elektrischen Eigenschaften des Systems analysiert (Abb. 4.18 a)). Die Konzentrationsänderung der Hydronium-Ionen aufgrund der verschiedenen pH-Werte (pH-Wert 6.5 und pH-Wert 4.5) kann gegenüber der Anzahl von Anionen und Kationen des Phosphatpuffers KH_2PO_4 vernachlässigt werden. Da die Doppelschicht oder die Dielektrizitätskonstante von der pH-Wertänderung nahezu unbeeinflusst bleiben, ändern sich die elektrischen Eigenschaften des Systems Elektrode-Elektrolyt nicht.

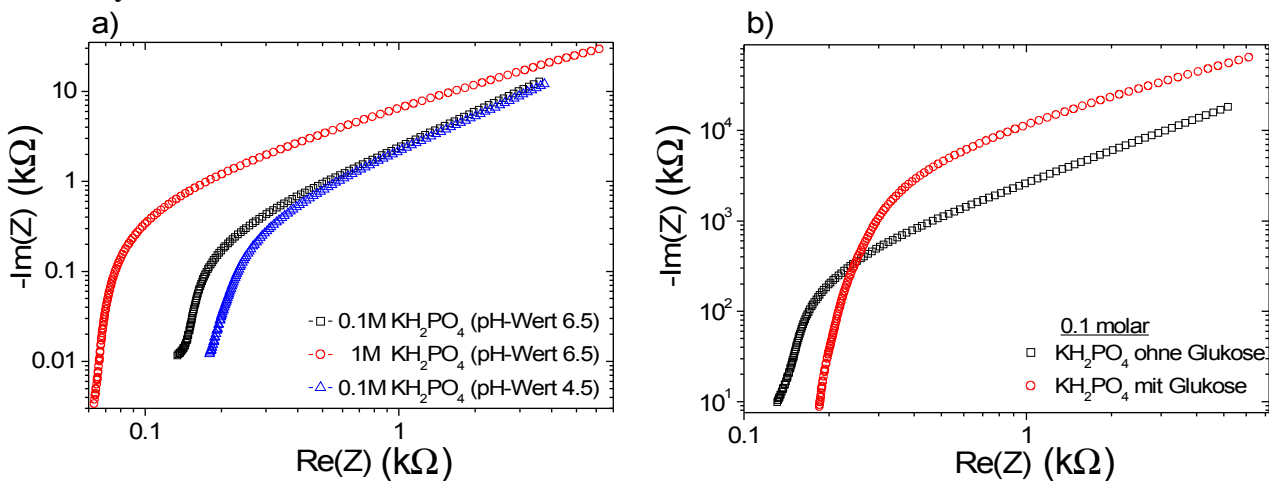


Abb. 4.18: Vergleich der Nyquistplot des Systems Elektrode-Elektrolyt
a) für verschiedene Molaritäten und pH-Werte des Phosphatpuffers KH_2PO_4
b) für 0.1 molares KH_2PO_4 (pH 6.5) mit und ohne Glukose [Günther, 2004]

In späteren Experimenten wird durch Glukosezugabe ein oszillierender Stoffwechsel der Hefezellen erreicht. Daher muss der Einfluss der Glukose auf die Gesamtimpedanz analysiert werden (Abb. 4.18 b)). Ein erhöhter Elektrolytwiderstand und eine verringerte Elektrolytkapazität zeichnen das System mit Glukose aus (Impedanzmessungen, vgl. im Anhang Abb. 8.2). Da die Imaginärteile beider Systeme übereinstimmen, können ein Einfluss der zusätzlichen Ionen auf die Doppelschicht, genau wie eine durch die Glukose induzierte Dispersion, ausgeschlossen werden.

4.4. Impedanzmessungen an Elektroden, Elektrolyt und Zellen

Abschließend wird das System von Elektroden und Elektrolyt um die biologische Komponenten erweitert, um den Einfluss der Zellen auf die Impedanzeigenschaften zu untersuchen. Die Nyquistplots von zwei verschiedenen Neuronenkulturen (15 DIV) besitzen den gleichen Verlauf und unterscheiden sich lediglich im Bahnwiderstand (Abb. 4.19).

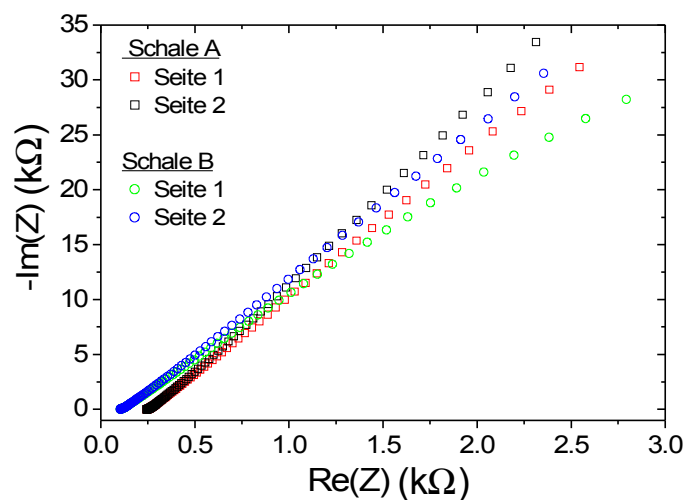


Abb. 4.19: Vergleich der Nyquistplots von zwei Kulturschalen mit Neuronen und aCSF

Da das zweidimensionale Neuronennetzwerk die Elektroden nicht vollständig abdeckt, und die Zellen im Vergleich zur Elektrolytmenge von 6 ml ein geringes Volumen aufweisen, ist der zu erwartende Einfluss auf die Gesamtimpedanz klein. Um dennoch einen möglichen Einfluss der Neuronen auf die Impedanz zu analysieren, werden an den gleichen Kulturschalen nach jedem Präparationsschritt (Elektrolyt; Elektrolyt und PDL-Beschichtung; Elektrolyt, PDL-Beschichtung und Neuronen) Impedanzuntersuchungen durchgeführt. So können zufällige Abweichungen, beispielsweise hervorgerufen durch verschiedene Zelldichten oder unterschiedliche Elektroden- bzw. Kontaktwiderstände, ausgeschlossen werden.

4. Charakterisierung von Elektroden, Elektrolyt und Zellen

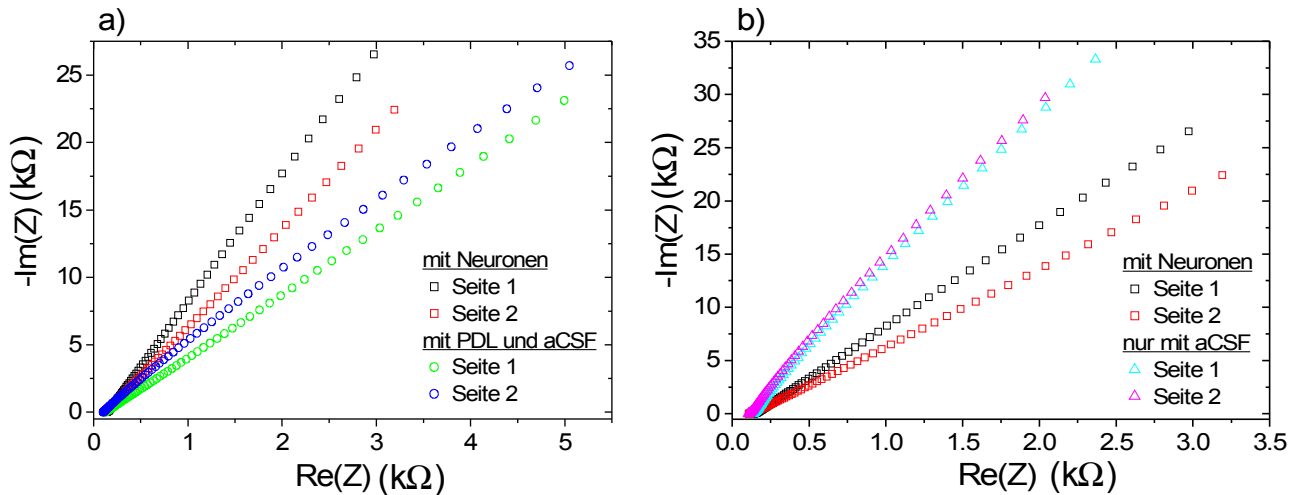


Abb. 4.20: Vergleich der Nyquistplots innerhalb einer Kulturschale
a) mit Neuronen und Eiweißbeschichtung+Elektrolyt (PDL+ aCSF)
b) mit Neuronen und Elektrolyt (PDL+ aCSF)

Die Impedanzmessungen von Elektrolyt und Neuronenkultur können nicht unterschieden werden (vgl. Abb. 4.20 b)). Das Frequenzverhalten der PDL-beschichteten Elektrode weicht im Bereich von 20 Hz bis 50 Hz geringfügig von dem Verhalten der Neuronenkulturen (vgl. Abb. 4.20 a)) ab. Da dieser Frequenzbereich durch die Doppelschicht bestimmt wird, ist wahrscheinlich das positiv geladene Eiweißmolekül PDL die Ursache für diesen Unterschied [Zhu et. al, 2004; Hong et al., 2006].

Die elektrostatische Wechselwirkung von positiver PDL-Schicht und negativ geladener Zellmembran, verantwortlich für das Anhaften der Zellen [Nevo et al., 1955; Katchalsky et al., 1959] und führt zu einem Ladungsgleichgewicht, so dass nicht zwischen Neuronennetzwerk (Zellen, PDL und Elektrolyt aCSF) und Elektrolyt (aCSF) unterschieden werden kann (vgl. Abb. 4.20 b)).

Neben den Neuronen dienen die Hefekulturen als Beispielsystem für die Anwendung der entwickelten Stimulationselektrode. Daher wird der Einfluss der suspendierten Hefezellen auf die Systemimpedanz analysiert. Ein Vergleich der Nyquistplots des Elektrolyten KH_2O_4 und des Elektrolyten KH_2PO_4 mit Hefezellen zeigt eine Dispersion. Die bei sehr geringen Frequenzen von einigen 10 Hz bis einigen 1000 Hz auftretende α -Dispersion kann aus Polarisierungseffekten der Doppelschicht und der Zellen (Membranleitfähigkeitsphänomenen, dem Aufladen von intrazellulären membrangebundenen Organellen oder Diffusionsprozessen von Ionen durch die Zellmembran) resultieren [Schwartz, 1962; Pething, 1987]; Martinsen, 2002].

Da Glukose die Impedanz des Gesamtsystem beeinflusst (vgl. Abb. 4.18 b)), wird das Frequenzverhalten von Hefezellsuspensionen unterschiedlicher Zelldichte analysiert. Neben der bereits detektierten α -Dispersion tritt die β_1 -Dispersion auf, die im Bereich von

ca. 1 MHz beobachtet wird [Asami et al., 1977, Asami et al., 1996]. Die β_1 -Dispersion wird dominiert durch die unterschiedlichen Leitfähigkeiten, die an Grenzflächen, hier speziell der Doppelschicht und der wenig leitfähigen Zellmembran bzw. Zellwand, auftreten [Pauly und Schwan, 1959]. Die β_1 -Dispersion tritt nur hervor, wenn die Sedimentation der Hefezellen bereits eingesetzt hat. Die damit verbundene Verringerung der Elektrodenfläche und der Anstieg des Elektrolytwiderstandes [Bieberich und Guiseppi-Elie, 2004] hat bei den Versuchen unter Glukosezugabe noch nicht eingesetzt, was durch das Fehlen der β_1 -Dispersion bestätigt wird.

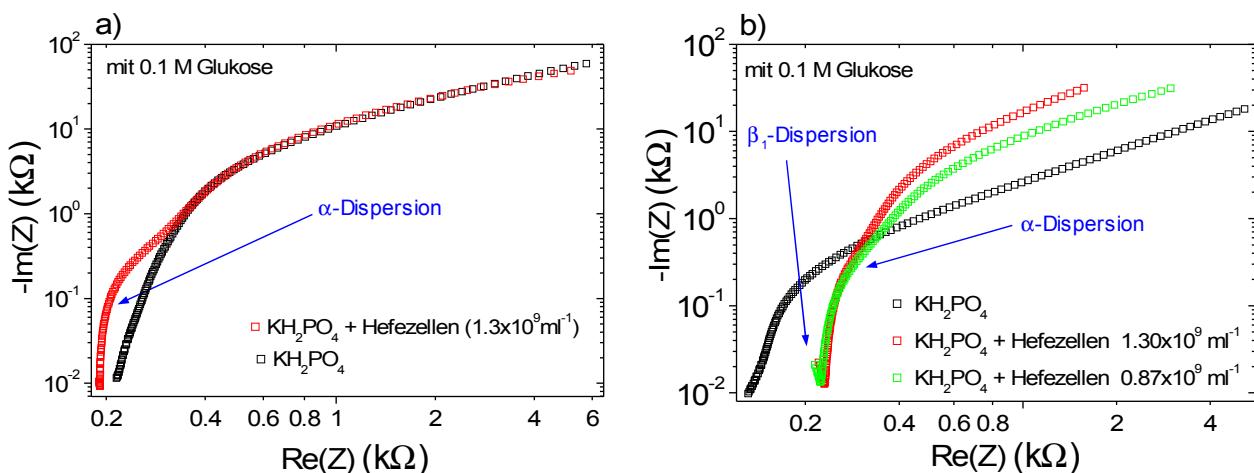


Abb. 4.21: Vergleich der Nyquistplots von

a) 0.1 molarem KH_2PO_4 (pH 6.5) + 0.1 molarer Glukose mit und ohne Hefezellen

b) 0.1 molarem KH_2PO_4 (pH 6.5) + 0.1 molarer Glukose mit Hefezellen verschiedener Dichte [Günther, 2004]

Eine Simulation der Impedanz von Hefezellen, ähnlich wie bei den Neuronenkulturen, ist mit dem aufgestellten Ersatzschaltbild nicht möglich. Grund hierfür ist das zu einfach gewählte Ersatzschaltbild, welches das deutlich andere Frequenzverhalten von Hefezellen nicht hinreichend genau beschreiben kann [Günther, 2004].

4.5. Feldverteilung im Elektrolyten

Neuronen können nur dann durch externe elektrische Felder angeregt werden, wenn die Potentialdifferenz entlang der Zellmembran und -fortsätze einen kritischen Schwellwert überschreitet. In Bereichen mit hoher elektrischer Feldstärke bzw. großen Potentialgradienten ist daher von einer direkten Anregung der Neuronen auszugehen. Da die gewählte Elektrodenstruktur stark der eines Plattenkondensators ähnelt, ist eine analoge Feld- bzw.

4. Charakterisierung von Elektroden, Elektrolyt und Zellen

Potentialverteilung zu erwarten.

Zur Bestimmung Potentialverlaufs wird mit einer Nadelelektrode die Fingerstruktur in 10 μm -Schritten in Elektrodenhöhe abgerastert und mit einem Elektrometer lokal das Potential gemessen (Abb. 3.12). Dabei wird zwischen den Elektroden ($s=0\text{ }\mu\text{m}$ und $s=250\text{ }\mu\text{m}$) ein konstantes Potential gemessen, welches aufgrund der verschiedenen verwendeten Nadelmaterialien schwankt (Abb. 4.22). Die gemessenen Potentiale korrelieren nicht ausschließlich mit den Standardpotentialen für Silber (Ag/Ag^+ : $+0.8\text{ V}$), Wolfram (W/W^{6+} : -0.09 V ; W/W^{4+} : -0.12 V), Platin (Pt/Pt^{2+} : $+1.2\text{ V}$) und Eisen (Fe/Fe^{3+} : -0.04 V ; Fe/Fe^{2+} : -0.44 V) [Bard et al., 1985]. Das höchste Elektrolyt-Potential kann der PtIr-Elektrode mit dem größten Standardpotential zugeordnet werden. Der geringste Spannungswert wird mit der Wolfram-Nadel gemessen. Das mit einer Stahl-Elektrode aufgenommene Potential müsste aufgrund des Standardpotentials kleiner als das mit einer Silber-Elektroden detektierte sein (Ag/Ag^+ : $+0.8\text{ V}$ und Fe/Fe^{3+} : -0.04 V bzw. Fe/Fe^{2+} : -0.44 V)

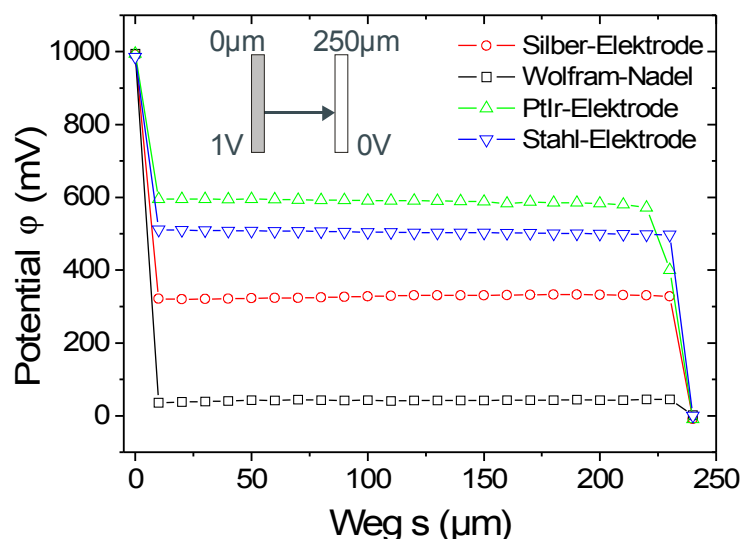


Abb. 4.22: Gemessener Potentialverlauf zwischen den Fingerelektroden mit aCSF in Höhe der Elektroden und mit verschiedenen Nadelmaterialien

Da bei der Messung des Potentialwertes zwangsläufig über die gesamte Elektrode integriert wird, können mögliche Potentialverläufe direkt über der Elektroden nicht aufgelöst werden. Eine Potentialmessung mit einer teflon-isolierten Stahlelektrode, die eine freiliegende Spitze von ca. 1 mm aufweist, kann diese Überlagerung eliminieren. Doch die Messungen ergeben einen ebenfalls konstanten Potentialverlauf zwischen den Elektroden (Abb. 4.22). Ein Einfluss des Nadeldurchmessers auf den Potentialverlauf kann bei den Messungen vernachlässigt werden. Der konstante Potentialverlauf wird so interpretiert, dass die im Elektrolyten vorliegenden Ladungsträger das Elektrodenpotential vollständig

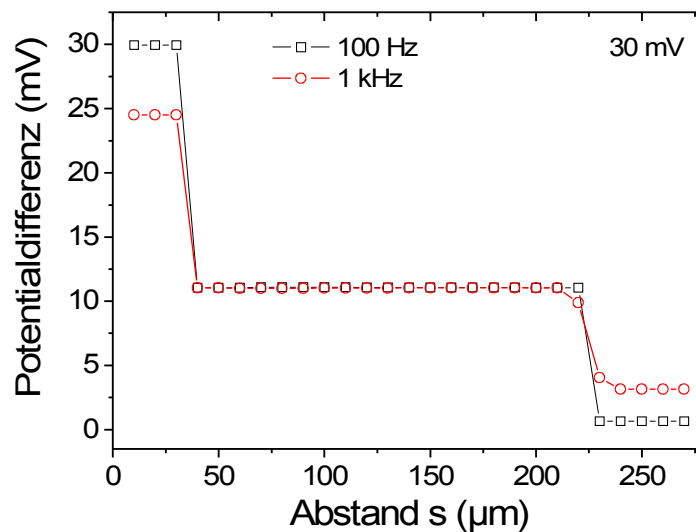


Abb. 4.23: Potentialdifferenz zwischen Referenz- und Messsignal zwischen den Stimulationselektroden mit aCSF bei 100 Hz und 1 kHz mit 30 mV (gemessen mit Wolfram-Nadelelektrode)

abschirmen; zwischen den Elektroden liegt ein nahezu feldfreier Bereich vor.

Zusätzlich zu dem Gleichspannungsverhalten soll untersucht werden, ob das Potential zwischen den Elektroden durch Anlegen einer Wechselspannung signifikant verändert wird. Mit Hilfe eines Lock-in-Verstärkers wird die Differenz zwischen Referenzsignal und mit der Nadel detektiertem Signal gemessen.

Das Referenzsignal wird an die Stimulationselektroden angelegt und lokal mit der Nadelelektrode das Potential gemessen. Die gemessene Potentialdifferenz in Abb. 4.23 zeigt, dass das Elektrodenpotential auch bei Anlegen einer Wechselspannung vollständig abgeschirmt wird. Die Ladungsträger des Elektrolyten folgen der angelegten Frequenz, was auf eine hohe Beweglichkeit schließen lässt. Diese Abschirmung wird durch vorhergehende Messungen des Effektivstrom des Elektrolyten aCSF (vgl. Abb. 4.10) und dem späten Auftreten der Polarisierungseffekte von Wasser bei einigen GHz [Kaatze, 1989] bestätigt.

Die Berechnung des Potentialverlaufs mit der Finite Elemente Methode stimmt nicht mit dem gemessenen überein [Günther, 2004]. Ursache hierfür ist wahrscheinlich, dass bei den Berechnungen das Modell eines polarisierbaren Dielektrikum als Elektrolyt, ähnlich der Beschreibung im Gehirn [McIntyre und Grill, (1999), Kuncel und Grill, 2004] verwendet wurde. Die frei beweglichen Ladungsträger des Elektrolyten, die das Elektrodenpotential abschirmen, werden nicht berücksichtigt.

Aufgrund des gemessenen Potentialgradienten an den Elektrodenkanten ist dort die höchste Stimulationseffizienz zu erwarten [Kuncel und Grill, 2004]

5. Anregung von biologischen Systemen

In diesem Kapitel wird die Verwendung der Elektrode für Stimulationszwecke an zwei verschiedenartigen biologischen System, den Neuronen und Hefezellen, getestet. Nach der Bestimmung der Stimulationsparameter werden die zellspezifischen Anregungsmechanismen untersucht.

5.1. Anregungsmechanismus von Neuronen

Im Folgenden wird die elektrische Anregung von Netzwerken und von Neuronen in Netzwerken mit blockierter synaptischer Transmission untersucht. Dabei wird die Abhängigkeit der Stimulationseffizienz von der Pulsamplitude, der Pulsbreite und der Pulsanzahl bestimmt. Mit Hilfe von speziell angeordneten Netzwerken und dem Blockieren der synaptischen Signaltransmission durch Zugabe von Neurotransmitterantagonisten der GABA_A- und Glutamat-Rezeptoren können bekannte Anregungsmechanismen von Netzwerken und Einzelneuronen verifiziert werden.

5.1.1. Bestimmung der Stimulationsparameter von Netzwerken

Um mit der neu entwickelten Elektrode interessante Fragestellungen zu bearbeiten, muss zunächst der Bereich für eine erfolgreiche Stimulation bestimmt werden. In Vorversuchen wird der Bereich für eine Stimulation von ± 1 V auf maximal ± 2.5 V begrenzt, um Zellschäden möglichst auszuschließen. Konkret wird ein Ausschnitt einer Kultur (16 DIV) mit 20 Zellen hinsichtlich des Spannungsbereiches untersucht (vgl. Abb. 5.1, DIC-Aufnahme).

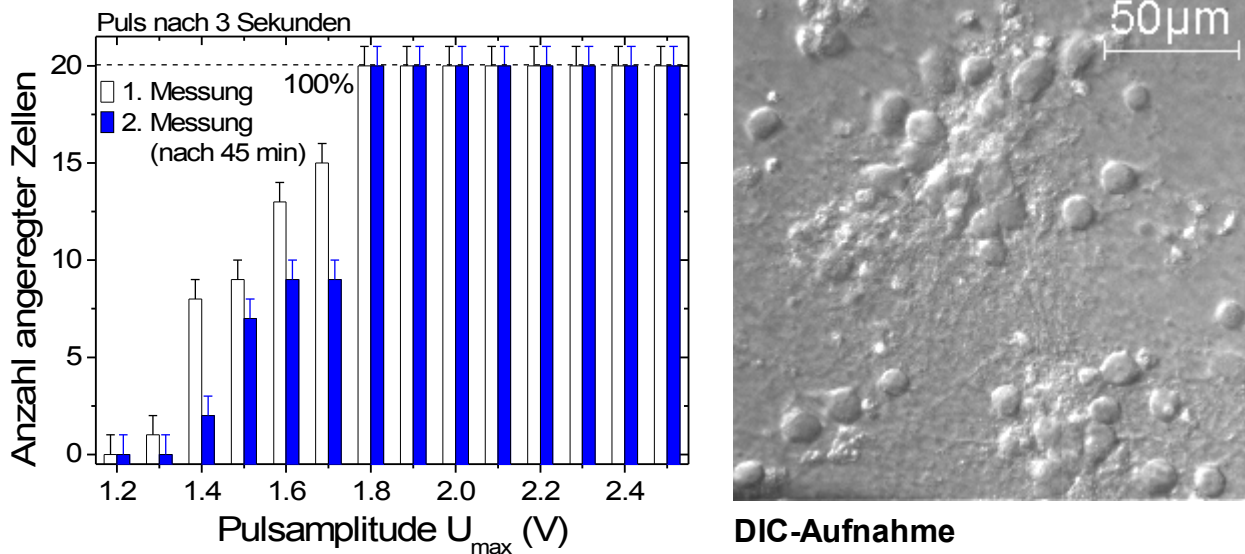


Abb. 5.1: Abhängigkeit der Anzahl der angeregten Neuronen (16 DIV) von der Pulsamplitude der biphasigen Doppelpulse, Wiederholungsmessung nach 45 min zur Überprüfung der Ergebnisse ($t_{PB}=1$ ms, Stimulation nach 3 Sekunden)

In einem Zeitintervall von 40 Sekunden findet eine Stimulation zu zwei fest definierten Zeitpunkten, in der 3. und 33. Sekunde, statt. Die Anregungsamplitude der biphasigen Doppelpulse mit einer Pulsbreite von 1 ms wird von ± 1.2 V bis ± 2.5 V in 0.1 V-Schritten zufällig variiert, um Sättigungseffekte zu vermeiden. Die Anzahl der angeregten Neuronen in der 3. und 33. Sekunde werden ausgezählt und in Abhängigkeit von der Amplitude dargestellt. Zur Überprüfung der erhaltenen Ergebnisse wird das Experiment nach einer 45 minütigen Pause wiederholt. Für eine effektive Stimulation sollte laut Abb. 5.1 und Abb. 5.2 eine Pulsamplitude $\geq \pm 2.2$ V gewählt werden.

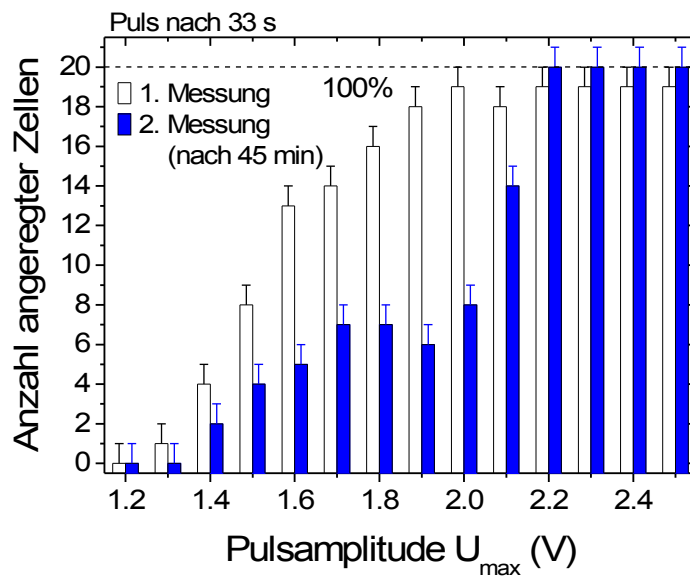


Abb. 5.2: Abhängigkeit der Anzahl der angeregten Neuronen (16 DIV) von der Pulsamplitude ($t_{PB}=1$ ms, Stimulation nach 33 Sekunden)

Ausschlaggebend für die Wahl dieses Wertes sind die Ergebnisse der Wiederholungsmessung in der 33. Sekunde (Abb. 5.2), wo erst bei Erreichen einer Amplitude von ± 2.2 V nahezu alle Zellen angeregt werden. Um Zellschäden so gering wie möglich zu halten bzw. ganz auszuschließen, muss die Pulsamplitude so klein wie möglich bei einer hohen Anregungseffizienz gewählt werden.

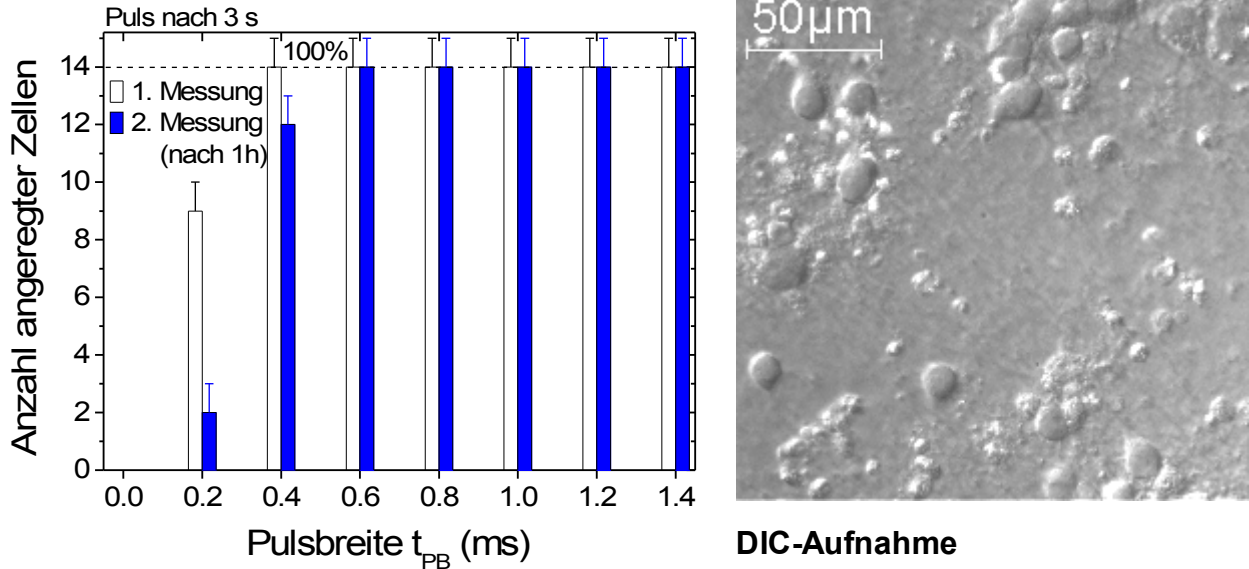


Abb. 5.3: Abhängigkeit der Anzahl der angeregten Neuronen (18 DIV) von der Pulsbreite ($U=\pm 2.2$ V, Stimulation nach 3 Sekunden)

Neben der Amplitude wird die Pulsbreite der Halbwellen variiert, um das Parameterfenster für die Stimulation weiter einzuschränken. Die Pulsbreite wird dabei in 200 μ s-Schritten von 0.2 bis 1.4 ms je Halbwelle unsystematisch verändert (Abb. 5.3, Abb. 5.4).

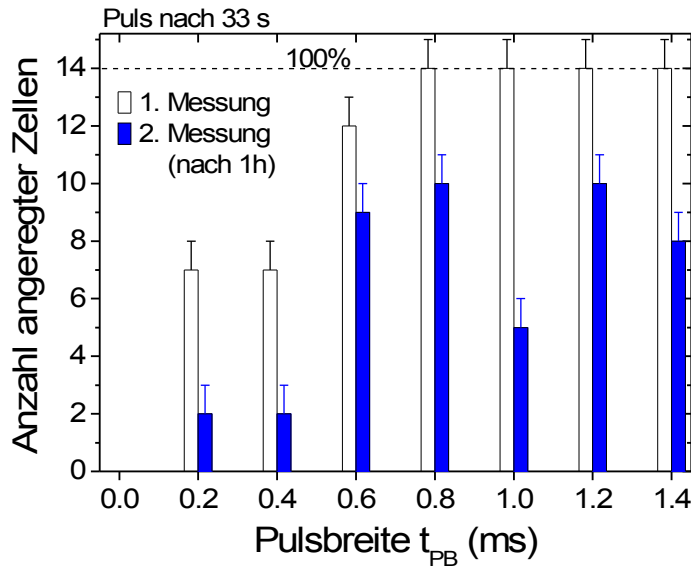


Abb. 5.4: Abhängigkeit der Anzahl der angeregten Neuronen (18 DIV) von der Pulsbreite ($U=\pm 2.2$ V, Stimulation nach 33 Sekunden)

5. Anregung von biologischen Systemen

Die experimentelle Vorgehensweise ist analog der Amplitudenvariation, wobei der zeitliche Abstand zwischen erster und zweiter (Wiederholungs-) Messung 60 Minuten und das Alter der Kultur 18 Tage betragen. Bei der Analyse der Anregungseffizienz ergibt sich eine Pulsbreite von ≥ 0.8 ms für die Anregung vieler Neuronen. Die Anzahl der stimulierten Zellen in Sekunde 33 der Wiederholungsmessung erreicht nicht mehr die maximal mögliche bzw. vorher stimulierbare Anzahl. Da systematisch der Wert von 14, Anzahl der Zellen im untersuchten Gebiet (vgl. Abb. 5.3, DIC-Aufnahme), unterschritten wird, können eine spontane Netzwerkaktivität, ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes Fluo3 aufgrund der wenigen Stimulationen und eine Zellschädigung ausgeschlossen werden. Eine mögliche Ursache für die verminderte Anregbarkeit der Neuronen ist ein Trennen von synaptischen Verbindungen, was jedoch nicht näher untersucht wird.

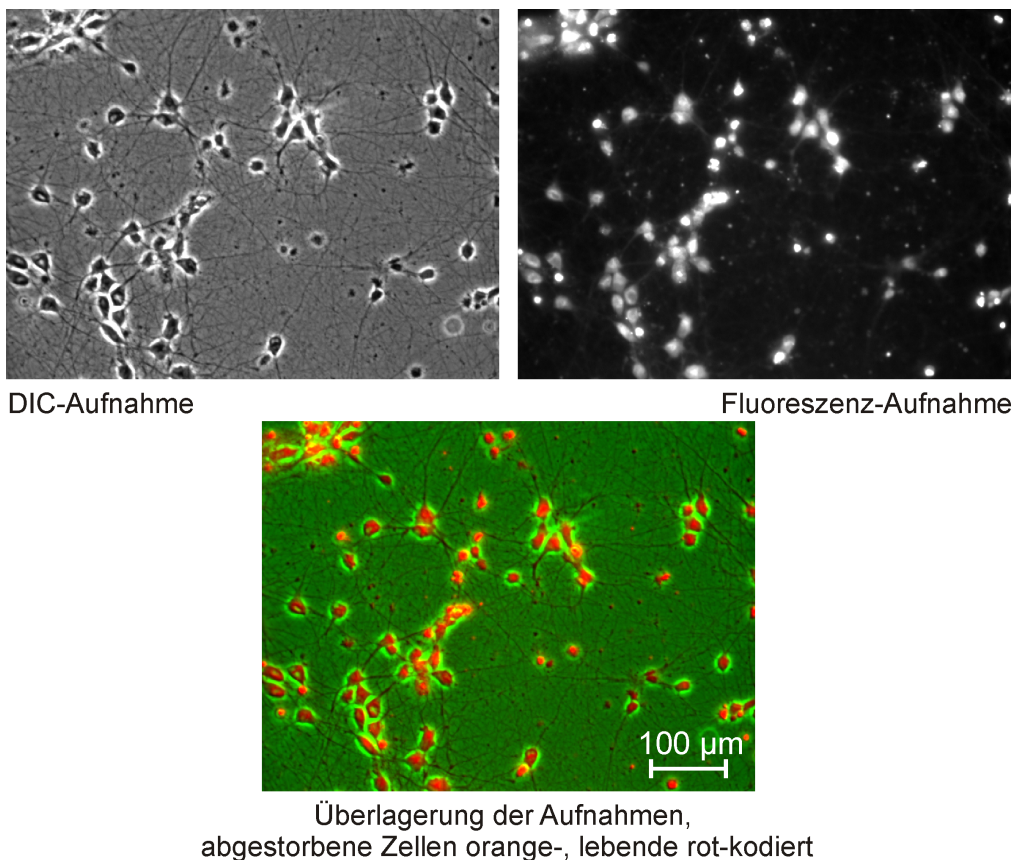


Abb. 5.5: Aufnahmen zur Bestimmung der lebenden und toten Neuronen in einem Netzwerkbereich einer Kultur nach 1 h Dauerstimulation (11 DIV)

Eine Zellschädigung, verursacht durch die Stimulation in Abb. 5.4, kann ausgeschlossen werden. In einem einstündigen Dauerstimulationsexperiment an einer 11 DIV Neuronenkultur wird an ein Elektrodenpaar alle 30 Sekunden ein biphasiger Doppelpuls ($U = \pm 2.2$ V, $t_{PB} = 1$ ms) angelegt. Nach der Stimationssequenz wird der nicht membranpermeable DNA-Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid ($C_{27}H_{34}I_2N_4$) dazugegeben. So ist gewährleistet, dass nur Zellen mit beschädigter Zellmembran angefärbt werden. Durch die Überlagerung

von DIC- und Fluoreszenz-Aufnahmen können die toten und lebenden Zellen je Netzwerk-bereich bestimmt werden (Abb. 5.5). Die 10 zufällig gewählten Bereiche auf der stimulierten Seite werden mit 10 Bereichen der unstimulierten Seite innerhalb der gleichen Kulturschale verglichen (Tab. 5.1), um eine mögliche Zellschädigung durch die Stimulation zu erkennen.

Tab. 5.1: Gesamtzellzahl und Anzahl der toten bzw. geschädigten Zellen in 10 Netzwerk-bereichen der Stimulations- und Referenzelektrode

Stimulationsseite		Referenzseite	
Zellanzahl	tote Zellen	Zellanzahl	tote Zellen
64	14	60	15
63	30	42	10
36	16	36	21
43	6	70	18
34	11	24	9
43	8	32	14
55	21	49	16
45	20	45	21
46	19	48	20
66	14	52	31
495	195	458	175
	32%		38%

In den Netzwerkbereichen der Stimulationselektrode haben 32% der Gesamtzellen eine beschädigte Membran, auf der unstimulierten Referenzseite sind es mit 38% nur unwesentlich mehr Zellen. Dieses Ergebnis zeigt, dass durch die Stimulation mit biphasigen Doppelpulsen einer Amplitude von ± 2.2 V und einer Pulsbreite von 1 ms keine Zellschäden verursacht werden. Ein Wiederholungsexperiment mit ebenfalls 120 Stimuli, jedoch innerhalb von vier Stunden, bestätigt, dass keine anregungsbedingten Zellschäden auftreten.

Die Flankensteilheit der Pulse wird kleinstmöglich gewählt, obwohl keine Abhängigkeit der Anzahl angeregter Neuronen von der Steilheit im untersuchten Bereich von 2 ns bis 500 μ s gefunden wurde (Abb. 8.3).

5. Anregung von biologischen Systemen

Aus den durchgeführten Experimenten ergeben sich für die Pulsamplitude $U = \pm 2.2$ V bzw. für die Pulsbreite $t_{PB} = 1$ ms als Parameter für eine hohe Anregungseffizienz. Mit diesen Parametern wird eine Netzwerkanregung über den gesamten Netzwerkbereich von ca. 1 cm ohne Zellschädigung erreicht, was in weit über 100 Einzelexperimenten nachgewiesen werden konnte.

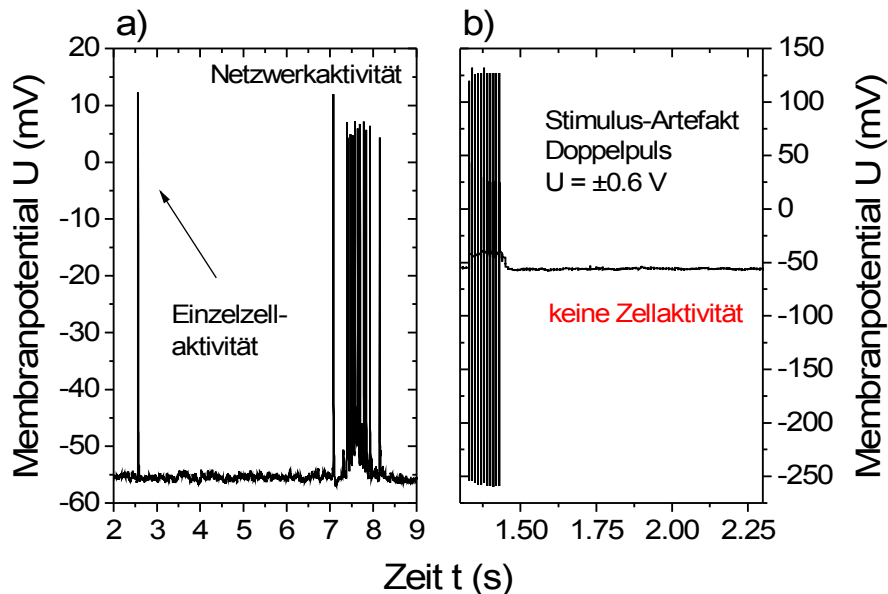


Abb. 5.6: Membranpotential eines gepatchten Neurons (20 DIV), a) spontane Aktivität, b) keine induzierte Aktivität nach einem Stimulationspuls

Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik¹ werden die mittels Calcium-Imaging bestimmten Stimulationsparameter überprüft, da sie den Vorteil der direkten Korrelation von Messsignal und zu untersuchender Zelle erlaubt [Opitz et al., 2002]. Beispielhaft sind in Abb. 5.6 a) typische spontane Zellaktivitätsmuster, ein einzelnes Aktionspotential und ein Netzwerkeignis, dargestellt. Bei der Variation der Pulsamplitude eines Doppelpulses der Pulsbreite $t_{PB} = 1$ ms kann schon bei einer Amplitude von $U = \pm 0.7$ V ein induziertes Aktionspotential nachgewiesen werden (Abb. 5.7 a)). Bei Unterschreiten dieser Spannung findet keine Anregung mehr statt (vgl. Abb. 5.6 b)). Eine synchrone Netzwerkanregung ist bei Pulsen mit $U = \pm 1.1$ V zu beobachten (Abb. 5.7 b)), was deutlich unterhalb des mit Calcium-Imaging bestimmten Wertes liegt. Grund hierfür ist, dass die Farbstofffluoreszenz des Fluo3 erst nach mehreren Aktionspotentialen und dem damit verbundenen Ca^{2+} -Einstrom hoch genug für eine Detektion ist. Das Calcium-Imaging ist also wesentlich unempfindlicher bei der Detektion der Zellaktivität als die Patch-Clamp-Technik. Da eine gleichzeitige Analyse der Aktivität vieler Zellen notwendig für die Untersuchung des Netzwerkverhalten ist, genügt das Anpatchen von Einzelneuronen nicht. Das Calcium-Imaging wird jedoch weiterhin für die Aufnahme der Zellaktivität nach elektrischer Anregung verwendet, da bei einer Stimulation mit Amplituden von $U = \pm 2.2$ V keine Zellschäden aufgetreten sind.

¹ gemessen von Dr. J. Kluewa

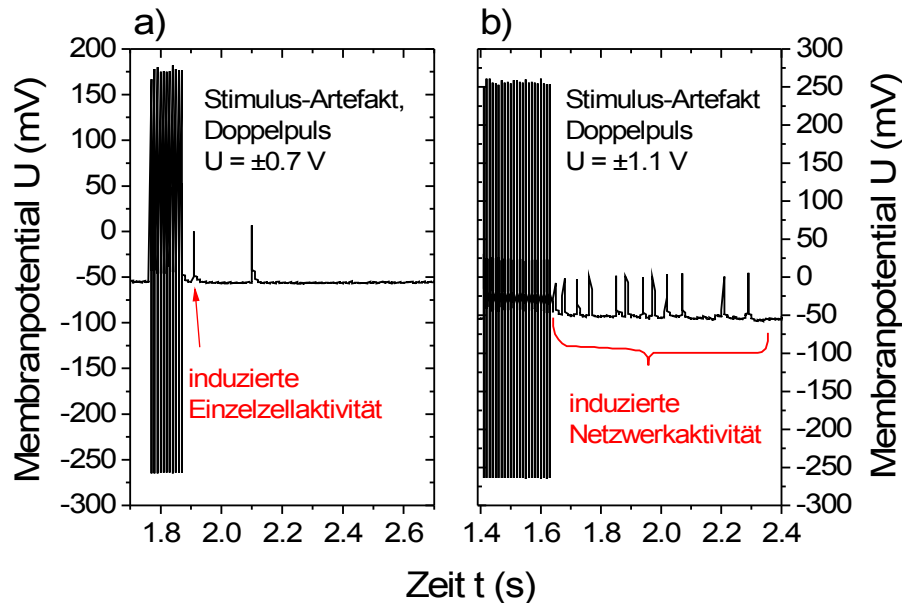


Abb. 5.7: Membranpotential eines gepatchten Neurons (20 DIV) während und nach Stimulation mit einem Doppelpuls
 a) von $U = \pm 0.7$ V, Auslösen eines einzelnen Aktionspotentials
 b) von $U = \pm 1.1$ V, Auslösen von Netzwerkaktivität

Es muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass bei einer Stimulation mit den Fingerstrukturen und den gewählten Parameter immer eine Netzwerkanregung erreicht wird. Dabei kann nicht zwischen direkter elektrischer Anregung und synaptischer Signalweiterleitung unterschieden werden. Die beobachtete Zellaktivität ist daher immer eine Überlagerung aus direkter Stimulation und synaptischer Signalweiterleitung, sofern diese nicht durch chemische Substanzen verhindert wird. Für die Untersuchung der Anregungsmechanismen mit den Fingerelektroden ist eine Zell-Zell-Anregung jedoch hinderlich. Daher wird im nächsten Kapitel nur die direkte Anregung von Einzelneuronen betrachtet.

5.1.2. Bestimmung der Stimulationsparameter für Einzelzellanregung

Um die GABA_A- und glutamat-gebundene synaptische Signaltransmission vollständig zu blockieren, wird ein Gemisch aus D-2-Amino-5-phosphopentanoischer Säure (APV, 50 μ M), 6-Cyano-7-Nitroquinoxaline-2,3-Dione (CNQX, 10 μ M), Bicucullin Methiodid (BMI, 20 μ M) und Picrotoxin (PTX, 10 μ M) in die Kulturschale appliziert. Die Blockade der glutamatergen NMDA- und AMPA-Rezeptoren erfolgt mit APV und CNQX, wobei die GABA_A-Rezeptoren mit BMI und PTX gehemmt werden [Voigt et al., 2005].

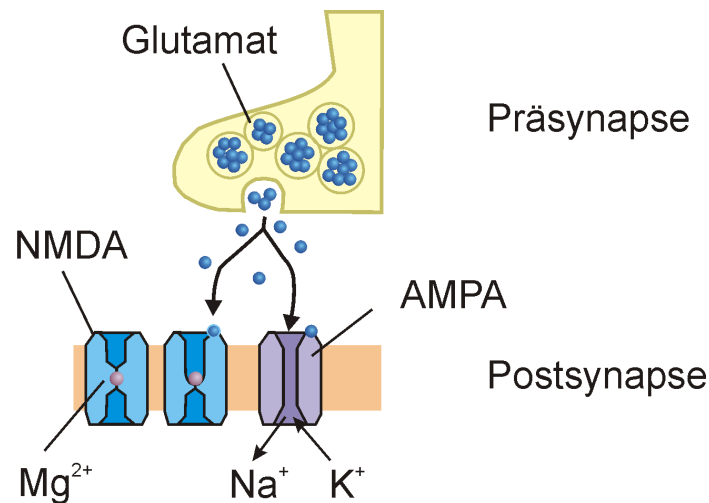


Abb. 5.8: Schematische Darstellung der glutamatergen NMDA- und AMPA-Rezeptoren [Liang, 2004]

Der vorher als effizient für eine Stimulation bestimmte Doppelpuls mit einer Amplitude von $U=\pm 2.2$ V wird an eine 15 DIV Neuronenkultur vor und nach Zugabe des Gemisches zum Blockieren der synaptischen Signaltransmission angelegt. Dabei wird in sechs Gebieten der Elektrode in Übereinstimmung mit den vorherigen Experimenten eine hohe Anregungseffizienz (Normierung der stimulierten Neuronen auf die Gesamtzellzahl im entsprechenden Bereich) von ca. 80% vor Zugabe der Neurotransmitterantagonisten beobachtet (Abb. 5.9 a), Kontrolle). Nach der Blockade der Signaltransmission werden nur noch vereinzelt Neuronen angeregt (Abb. 5.9 b), Blockiert). Dieses Ergebnis einer schwachen Anregung konnte in diversen Netzwerken unterschiedlichen Alters (9, 12, 14, 15 DIV) in 43 untersuchten Zellbereichen verifiziert werden (Abb. 5.10 a)).

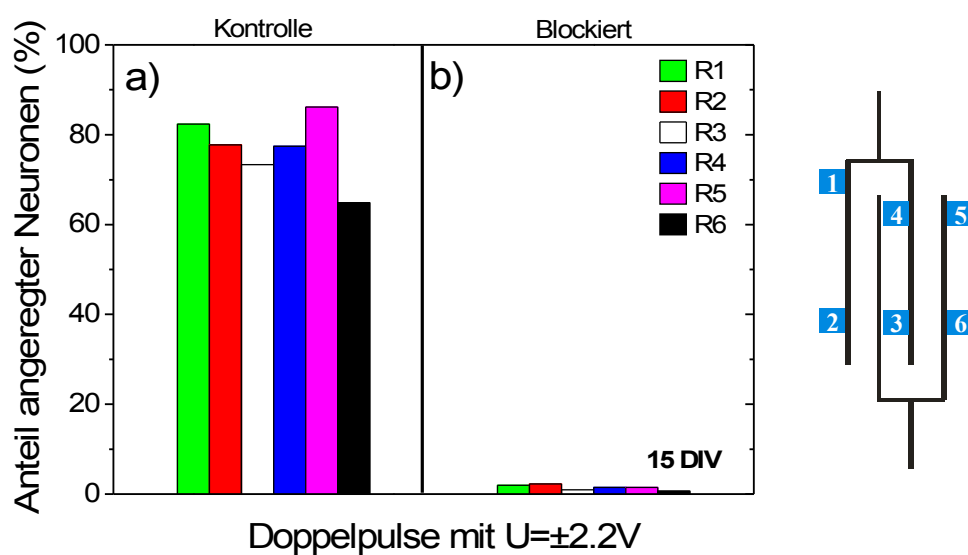


Abb. 5.9: Anteil angeregter Neuronen vor Blockade der synaptischen Transmission (Kontrolle) und nach Zugabe der Neurotransmitterantagonisten (Blockiert)

Da die geringe Reaktion auf Stimuli für Analysen des Anregungsmechanismus nicht ausreicht, muss eine Anpassung der Pulsparameter erfolgen. Daher werden im Folgenden die Pulsanzahl und anschließend die Pulsamplitude variiert. Mit der Erhöhung der Pulsanzahl ist ein Anstieg der Anregungseffizienz von Netzwerken mit und ohne synaptischer Signaltransmission verbunden (Abb. 5.10).

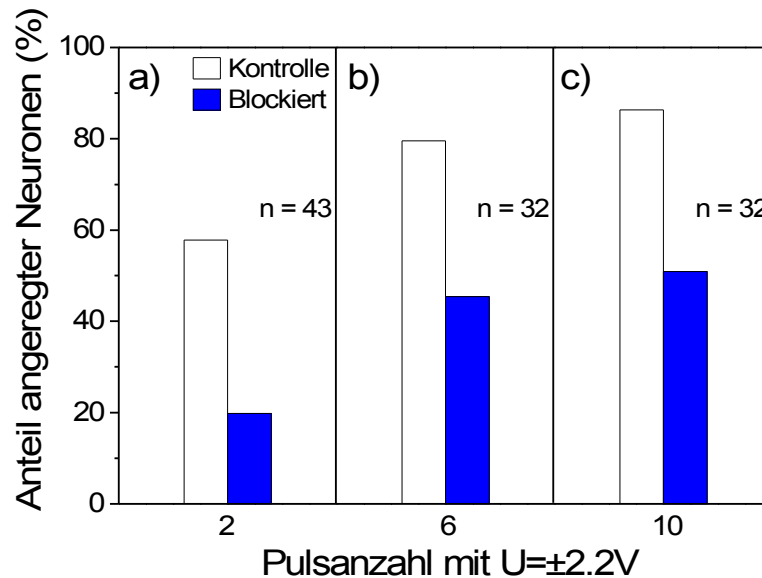


Abb. 5.10: Vergleich der Anregungseffizienz von Netzwerken mit und ohne synaptischer Transmission in Abhängigkeit von der Pulsanzahl

Die Tatsache, dass in nicht blockierten Netzwerken mit einem Doppelpuls nicht die maximale Anzahl erregbarer Zellen stimuliert wird (Abb. 5.10 a)), steht scheinbar im Gegensatz zu den experimentellen Ergebnissen des Kapitels 4.6.1., wo mit einem Doppelpuls nahezu alle Zellen angeregt werden konnten. Die Abweichung in der Effizienz wird durch die Größe des analysierten Bereiches verursacht. In den Experimenten mit Netzwerkanregung werden lediglich Netzwerkgebiete einer Größe von $190 \times 190 \mu m^2$ zwischen zwei Elektrodenfingern untersucht (vgl. Bereich 3 und 4 in Abb. 5.9), in denen sich 14 bzw. 20 Neuronen befinden. Für eine genauere Bestimmung der Anregungsparameter von Einzelneuronen wird ein größerer Bereich ($380 \times 380 \mu m^2$) mit teilweise über 100 Zellen sowohl zwischen den Elektrodenfingern als auch in unmittelbarer Nähe analysiert (vgl. Abb. 5.9). Da die Anregung des Netzwerkes u.a. von der Konnektivität der Zellen abhängig ist [Maeda et al., 1995], ist davon auszugehen, dass bei den vorangegangenen Versuchen lokale, stark vernetzte Zellenbereiche analysiert wurden. Bei einer Vergrößerung der beobachteten Zellregion wird auch die Aktivität von Neuronen erfasst, die nicht so stark mit den elektrisch angeregten Zellen verbunden sind. Da heißt, dass die Anzahl ankommender präsynaptischer Signale zu gering ist, um ein Aktionspotential auszulösen. Eine Erhöhung der Pulsanzahl (tetanische Stimulation) steigert aufgrund der wiederholten Potential-

differenzen die Anzahl der ausgelösten Aktionspotentiale [Perez et al., 1999; Jimbo et al., 1993] der direkt erregbaren Neuronen. Dieser Effekt ist mit dem Ca^{2+} -Imaging (Integrationszeit von 550 ms) nicht auflösbar, erhöht jedoch die absolute Anzahl ankommender Eingangssignale der Postsynapse und löst im Neuron ein Aktionspotential aus. Unter Beachtung des vergrößerten Netzwerkbereichs und der Konnektivität der Neuronen kann also der Effekt der Erhöhung der Stimulationseffizienz für nicht blockierte Netzwerke erklärt werden. Nach Zugabe der Neurotransmitterantagonisten ist der Anteil angeregter Zellen sehr klein und steigt dann mit Erhöhung der Pulsanzahl an. Ursache hierfür ist ebenfalls die Superposition der wiederholten Potentialdifferenzen, die schließlich zum Auslösen eines Aktionspotentials führen.

Die weitere Erhöhung der Pulsanzahl über 10 hinaus erscheint nicht nötig, da einerseits nahezu alle Zellen, das heißt 90% der Gesamtneuronenanzahl, (vgl. Abb. 5.10 c)) stimuliert werden und andererseits nicht mehr Pulse als nötig für die Anregung verwendet werden müssen, um Zellschäden zu vermeiden.

Nach der Variation der Pulsanzahl wird der Einfluss der Pulsamplitude auf die Stimulationseffizienz untersucht. Da in Vorversuchen Zellschäden bei einer Amplitude von $U=\pm 2.5$ V beobachtet werden konnten, ist für die generelle Analyse der Spannungsabhängigkeit die Pulsamplitude zunächst auf $U=\pm 2.0$ V beschränkt. In fünf verschiedenen Netzwerkbereichen (Kulturen 16 bzw. 19 DIV) wird die Pulsamplitude von ± 1.0 V, in 0.1 V-Schritten, auf ± 2.0 V jeweils vor und nach Zugabe von APV, BMI, CNQX und PTX erhöht. Ohne Zugabe der Neurotransmitterantagonisten werden mit einer Amplitude von ± 1.4 V nahezu alle erregbaren Neuronen stimuliert. Die leicht verringerte Effizienz für ± 1.3 V wird durch spontane Aktivität in einem untersuchten Bereich hervorgerufen.

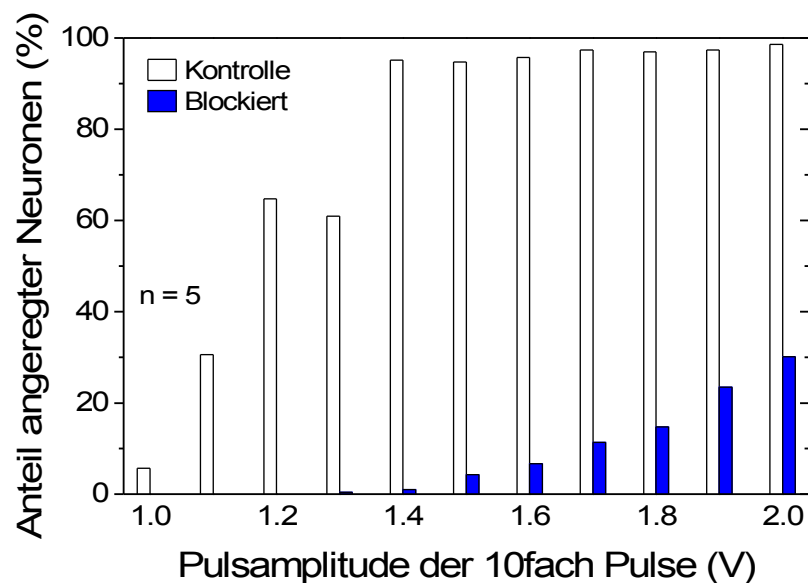


Abb. 5.11: Vergleich der Anregungseffizienz von Netzwerken mit und ohne synaptischer Transmission in Abhängigkeit von der Pulsamplitude

Nach dem Blockieren der Glutamat- und GABA_A-Rezeptoren ist die Stimulationseffizienz für alle gewählten Pulsamplituden stark herabgesetzt. Eine elektrisch induzierte Aktivität nach Blockieren der Signalweiterleitung kann erst für Amplituden $\geq \pm 1.4$ V beobachtet werden. Mit steigender Pulsamplitude nimmt die Stimulationseffizienz zu, wobei bei ± 2.2 V keine Sättigung erreicht wird. Die Entwicklung der Anzahl erregter Zellen lässt vermuten, dass eine weitere Erhöhung der Pulsamplitude die Stimulationseffizienz steigert. Da aber bei ± 2.5 V Zellschäden beobachtet werden und in Langzeitstudien mit ± 2.2 V keine toxischen Reaktionen auftreten, wird für eine effektive Stimulation ein 10fach-Puls der Amplitude von ± 2.2 V vorgeschlagen und nachfolgend immer verwendet.

Nach der Bestimmung der Parameter zur Anregung von Einzelneuronen nach Unterdrücken der synaptischen Transmission, soll mit den neu entwickelten Elektroden der Anregungsmechanismus selbst untersucht werden.

5.1.3. Analyse des Anregungsmechanismus von Neuronen

Eine elektrische Anregung von Neuronen ist nur möglich, wenn die Zellmembran durch Potentialunterschiede über einen Schwellwert depolarisiert und ein Aktionspotential generiert wird. Um den Anregungsmechanismus zu untersuchen, wird von einem Modell ausgegangen, das die Neuronen als polarisierbare Kugeln in einem Plattenkondensator betrachtet. Unter der Berücksichtigung, dass sich die Feldstärke an den Elektrodenkanten am stärksten ändert, wird eine erhöhte Anregungseffizienz im Bereich der Elektrodenkanten erwartet. Zur Überprüfung dieses Modells wird der zu analysierende Bereich in acht gleich große Gebiete unterteilt (vgl. Abb. 5.12).

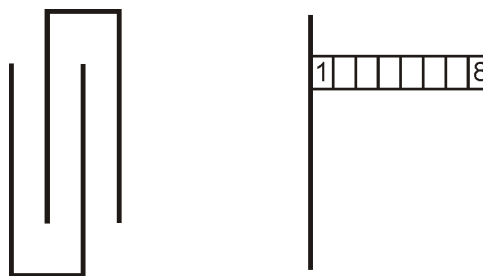


Abb. 5.12: Aufteilung des Abstandes zwischen zwei Elektrodenfingern in 8 Bereiche

In den DIC- und Fluoreszenzaufnahmen wird die Anzahl der angeregten Neuronen in den entsprechenden Bereichen bestimmt, um eine Normierung vorzunehmen. Für die Auswertung hat es sich als günstig herausgestellt, die Anzahl der angeregten Zellen der synaptisch blockierten Netzwerke auf die stimulierbare Anzahl in unblockierten Netzwerken für jedes Feld zu normieren.

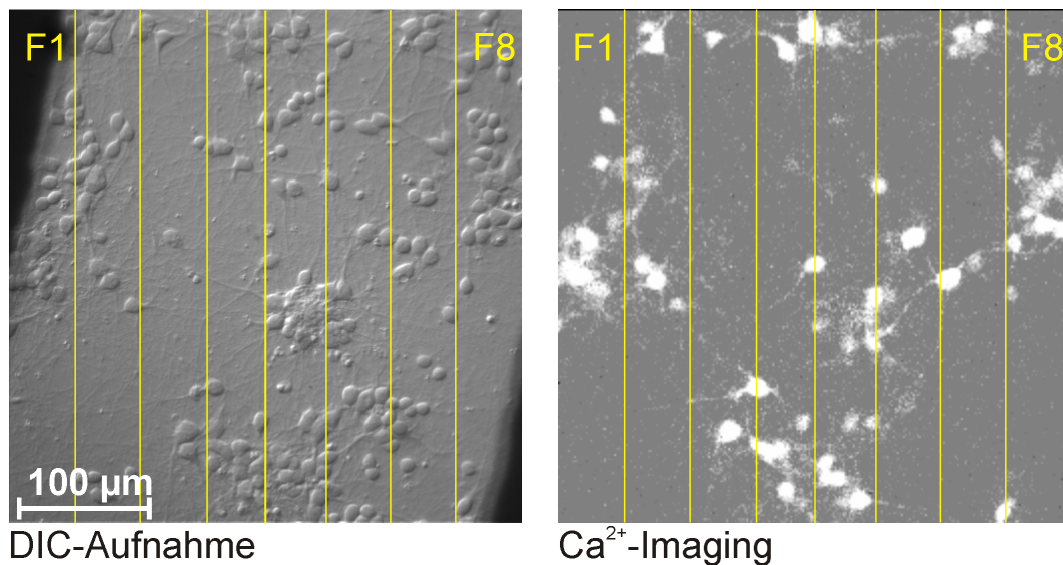


Abb. 5.13: Aufteilung der DIC- und Fluoreszenz-Aufnahme zur Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Anzahl angeregter Neuronen

Der Vorteil hierbei ist, dass die inhomogene Verteilung der Neuronen berücksichtigt wird und nicht stimulierbare Zellen bei der Betrachtung unberücksichtigt bleiben. Bei der Analyse der Anregungsverteilung eines 9 DIV Netzwerkes zwischen den Elektrodenfingern (vgl. Abb. 5.13) in Abhängigkeit der Feldstärke scheint es eine Korrelation zu geben, da in den Bereichen der Elektrodenkanten die Stimulation sehr effektiv ist (Abb. 5.14). Auffällig ist allerdings, dass für kleine Pulsamplituden die Anregung an einer Elektrode bevorzugt ist. Der Einfluss der Polung auf die Anregungseffizienz von Neuronen wird anhand von vier Netzwerkbereichen zwischen den Elektrodenfingern analysiert.

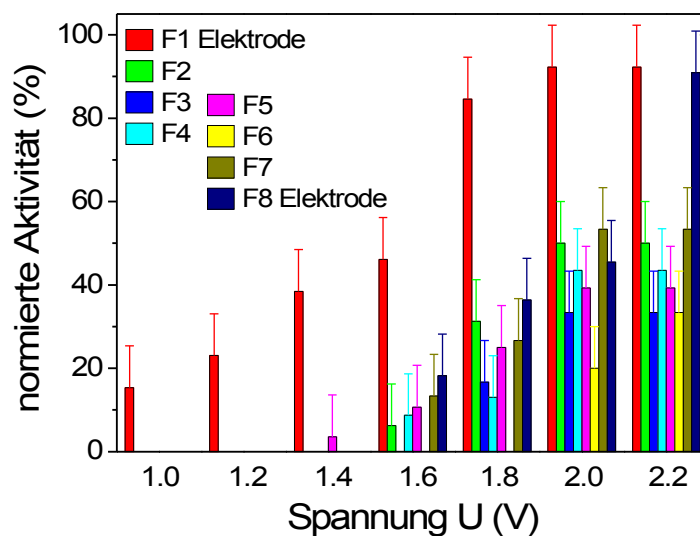


Abb. 5.14: Abhängigkeit der Stimulationseffizienz der Neuronen (9 DIV) in blockierten Netzwerken von der lokalen Feldstärke und der Pulsamplitude

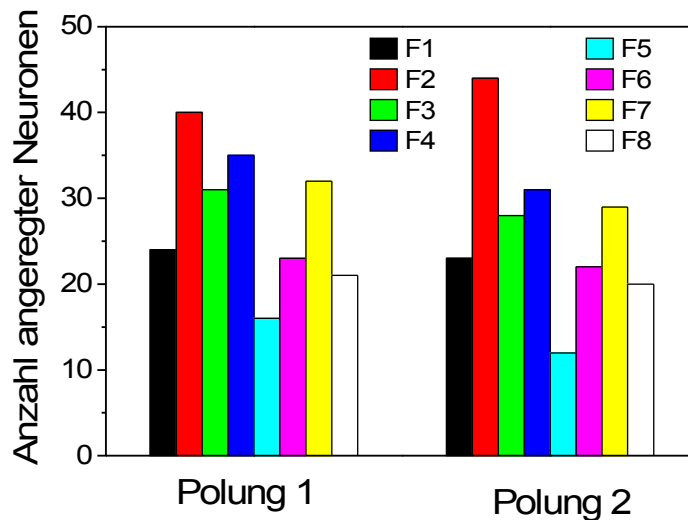


Abb. 5.15: Abhängigkeit der Anzahl stimulierter, blockierter Zellen einer 13 Tage alten Kultur von der Polung der Elektroden

Nach dem Umpolen der Elektroden wird das Experiment wiederholt. Da jedoch in Abb. 5.15 keine Abhängigkeit der Polung auftritt, kann ein signifikanter Einfluss ausgeschlossen werden. Beide Elektroden stimulieren mit gleich hoher Effizienz.

Die in Abb. 5.14 gefundene Korrelation von Anregungsverteilung und lokaler Feldstärke war zufällig und nur eine von vielen gemessenen Varianten. Die in Abb. 5.16 und Abb. 5.17 dargestellten Verteilungen stehen stellvertretend für alle anderen und sollen die Variabilität der aufgetretenen Verteilungen verdeutlichen. In Abb. 5.16 ist die Anregungsverteilung eines Netzwerkbereiches bestimmt, der sich in unmittelbarer Nähe zu einem Elektrodenfinger befindet, d.h. es gibt nur auf einer Seite eine Änderung der Feldstärke.

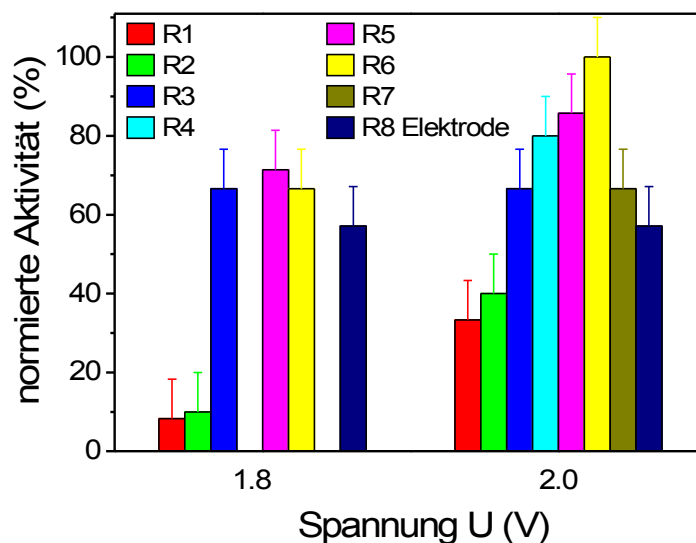


Abb. 5.16: Abhängigkeit des Anregungsortes von der lokalen Feldverteilung und der Pulsamplitude einer Neuronenkultur (15 DIV) mit blockierter synaptischer Transmission (Elektrode in R8, Stimulation mit einem 10fach-Puls)

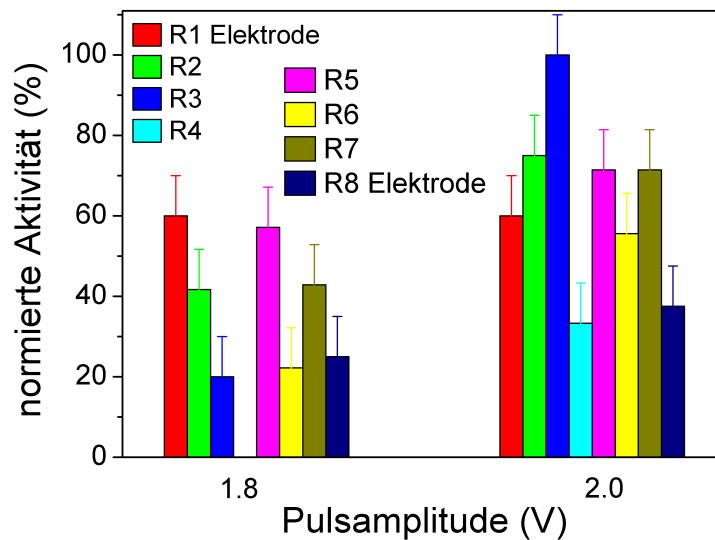


Abb. 5.17: Abhängigkeit des Anregungsortes von der lokalen Feldverteilung und der Pulsamplitude einer Neuronenkultur (14 DIV) mit blockierter synaptischer Transmission (Elektroden in F1 und F8, Stimulation mit einem 10fach-Puls)

Entgegen den Erwartungen des Modells ist die Stimulation nicht in unmittelbarer Nähe der Elektrode am effektivsten, sondern ca. in der Mitte des Netzwerkbereiches. In einem anderen Beispiel (vgl. Abb. 5.17) ändert sich die lokale Anregungsverteilung, wenn die Pulsamplitude des 10fach-Pulses von ± 1.8 V auf ± 2.0 V erhöht wird. Bei der Stimulation mit ± 1.8 V scheinen eine Elektrode und ein mittlerer Bereich bevorzugt. Wird die Amplitude jedoch geringfügig erhöht, so findet sich die effektivste Anregung erneut in dem mittleren Netzwerkbereich.

Da die ermittelten Anregungsverteilungen der Neuronen nicht mit dem Modell der polarisierbaren Kugeln in einem Plattenkondensator erklärbar sind, muss ein anderer Anregungsmechanismus vorliegen.

Bei der Betrachtung eines Neurons zwischen den Elektrodenfingern fällt auf, dass die Ausdehnung der Zellfortsätze, Dendriten und Axone, wesentlich größer als die des Somas ist (vgl. Abb. 5.18, Färbung mit Lucifer Yellow CH [Huettnner und Baughman, 1988]¹). Die Größe des Somas liegt im 20 μm -Bereich. Die Zellfortsätze hingegen können Distanzen von bis zu einigen Millimetern überspannen. Unter diesem Gesichtspunkt muss eine Anregung der Neuronen über die Zellfortsätze in Betracht gezogen werden, obwohl eine erfolgreiche Stimulation oft als Depolarisation der unteren Zellmembran entlang des Somas interpretiert wird [Rutten et al., 2001; Bove et al., 1995].

Diese Interpretation ist naheliegend, da nur Neuronen betrachtet werden, die die Elektroden des verwendeten Multi-Elektroden-Arrays vollständig abdecken. Andererseits weisen

¹ gemessen von Dr. T. Opitz

Stimulationsexperimente im visuellen Kortex von Ratten darauf hin, dass nur die Axone, jedoch nicht die Somata angeregt werden [Nowak und Bullier, 1998b].

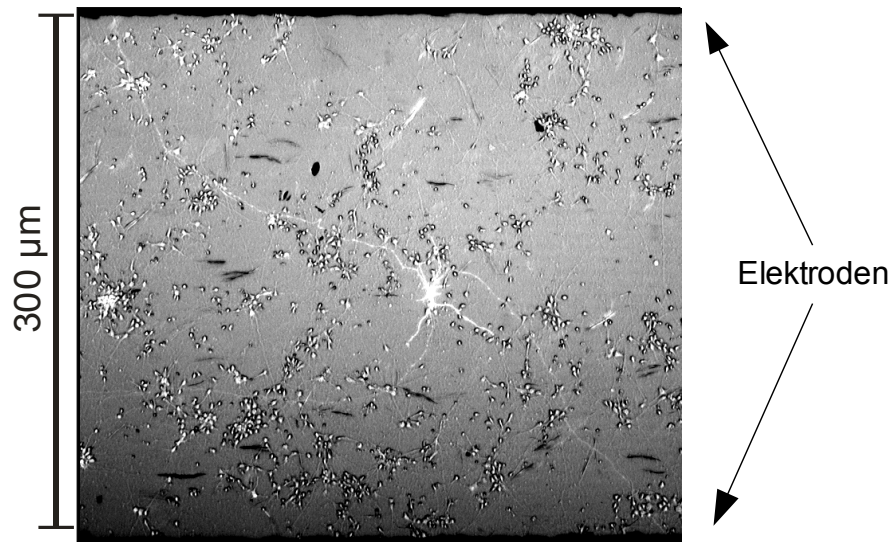


Abb. 5.18: Mikroskopische Aufnahme eines mit Lucifer Yellow CH gefärbten Neurons zur Veranschaulichung der Ausdehnung zwischen zwei Elektrodenfingern (schwarze Linien oben und unten)

Die antidrome Stimulation konnte in hochorganisierten Gehirnstrukturen [Harvey, 1980; Taylor und Dudek, 1984] nachgewiesen werden und findet Berücksichtigung in theoretischen Arbeiten [McIntyre und Grill, 1999; Rattay, 1999]. In Stimulationsexperimenten an dissoziierten Netzwerken auf Silizium-Substraten und MEA-Strukturen zeigte sich, dass Zellfortsätze sensibler auf Stimuli reagieren als der Zellkörper selbst [Wagenaar et al., 2004; Starovoytov et al., 2005]. In den Studien von Wagenaar et al. und Starovoytov et al. werden Einzelneuronen betrachtet. Da mit den entwickelten Elektroden jedoch immer ausgedehnte Netzwerkbereiche stimuliert werden und eine gezielte Einzelzellanregung nur eingeschränkt durch Blockieren der synaptischen Transmission möglich ist, muss ein spezieller Versuchsaufbau entwickelt werden, um die These der antidromen Stimulation zu überprüfen.

Um den Anregungsmechanismus von Einzelneuronen zu untersuchen, muss die synaptische Signaltransmission in speziell strukturierten Netzwerken (vgl. Abb. 5.20) blockiert werden, was durch Zugabe der Substanzen APV, BMI, CNQX und PTX erreicht wird. Mit Hilfe von Silikon-Matrizen werden die Neuronen nur in die gewünschten Bereiche (grau dargestellt) plattiert. Nach ca. 6 Stunden werden die Matrizen entfernt und die Zellfortsätze können sich ungehindert ausbilden. Die zwei speziell angeordneten Bereiche **c** und **d** (vgl. Abb. 5.20) werden zur Analyse des Anregungsmechanismus verwendet. In Fall **c** wird ein Netzwerk untersucht, welches sich 1.5 mm entfernt von einem Elektrodenfinger befindet.

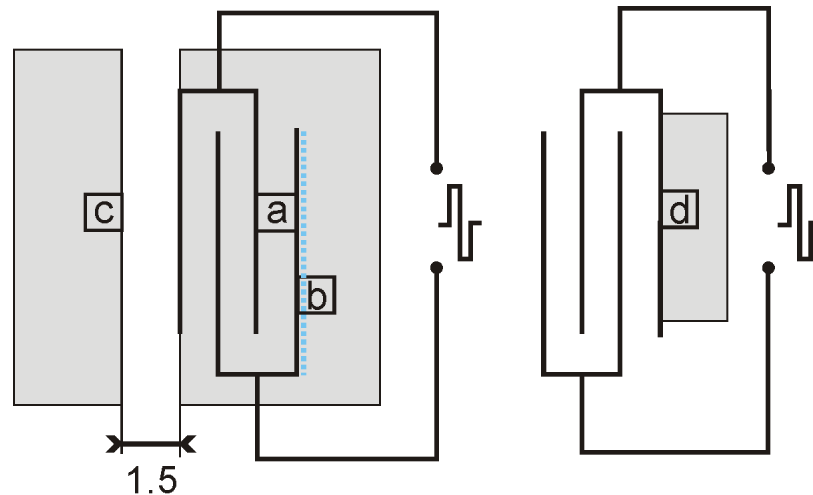


Abb. 5.20: Verschiedene Netzwerkbereiche in unterschiedlichen Positionen zu den Elektrodenfingern, **a** und **b** repräsentieren Kontrollnetzwerken, **c** eine Netzwerkregion 1.5 mm von den Elektroden entfernt und **d** ein Mini-Netzwerk in unmittelbarer Nähe zu Elektroden. Die grauen Bereiche markieren die mit Zellkörpern plattierten Gebiete, wobei sich die Axone und Dendriten frei über das Deckglas ausbreiten können. Die gestrichelte Linie markiert die Stelle, an der das Netzwerk durchtrennt wird, um axonale Stimulation auszuschließen.

Die Neuronen in Netzwerk **c** verbinden sich mit Neuronen in unmittelbarer Nähe und mit Neuronen, die sich auf und zwischen den Elektrodenfingern befinden. Da die Neuronen innerhalb von 12 Tagen Axonlängen von mehr als 2 mm erreichen [Voigt et al., 2005], ist eine Vernetzung der Neuronen aus Bereich **c** mit den Zellen zwischen den Elektrodenfingern gewährleistet. Ein Überwachsen der Elektrodenkante im Bereich **d** für Kulturen ≥ 12 DIV ist dann ebenfalls gesichert. Da eine direkte Anregung des Zellkörpers ausgeschlossen werden kann, erfolgt die Stimulation über eine Potentialänderung entlang des Axon. Zur Überprüfung dieser These wird nach dem Blockieren der Glutamat- und GABA_A-Rezeptoren der Bereich **c** mit einem 10fach-Puls der Amplitude ± 2.2 V stimuliert. In dem 1.5 mm von den Elektroden entfernten Bereich sind das elektrische Feld bzw. eine Potentialänderung vernachlässigbar und lösen kein Aktionspotential aus.

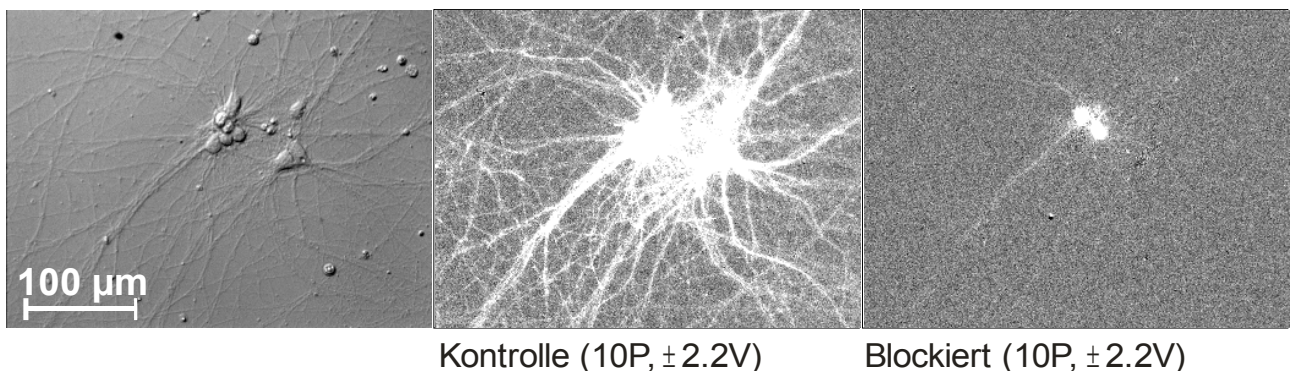


Abb. 5.19: DIC- und Fluoreszenzaufnahmen eines Netzwerkbereiches **c** während der Stimulation mit einem 10fach-Puls der Amplitude ± 2.2 V vor und nach Zugabe von APV, BMI, CNQX und PTX zum Nachweis der axonalen Stimulation (14 DIV)

Eine Anregung kann also nur über axonal induzierte Potentialänderung, die an der Elektrodenkante am größten ist (vgl. Abb. 4.22), erreicht werden.

In vier von acht untersuchten Bereichen **c** kann eine direkte Anregung der Neuronen durch axonale Stimulation nachgewiesen werden (vgl. Abb. 5.21 **c**). Als Beispiel wird ein Netzwerkbereich mit acht Neuronen gewählt, der vor und nach Blockieren der Glutamat- und GABA_A-Rezeptoren stimuliert wird (Abb. 5.19). Vor dem Blockieren der synaptischen Transmission werden alle Neuronen stimuliert (vgl. Abb. 5.19, Kontrolle), wobei danach nur bei zwei Neuronen ein Aktionspotential ausgelöst wird (vgl. Abb. 5.19, Blockiert). Es ist also davon auszugehen, dass beide Neuronen direkt durch den elektrischen Puls axonal erregt werden und ihre weitergeleiteten Aktionspotentiale im unblockierten Fall zu einer Netzwerkaktivität führen. Diese Annahme wird durch Experimente an Netzwerken mit durchtrennten Axonen gestützt. Nach erfolgreicher Stimulation der synaptisch blockierten Netzwerkbereiche **b** (vgl. Abb. 5.20) werden die Axone entlang der gestrichelten Linie mit einem Skalpell durchtrennt und erneut stimuliert. In keinem der sechs untersuchten Bereiche konnte nach dem Durchtrennen der Axone ein Aktionspotential detektiert werden. Erst nach dreimaligem Auswaschen der Glutamat- und GABA_A-Rezeptor-Antagonisten wird eine schwache Aktivität nach einem elektrischen Puls aufgrund der synaptischen Signalweiterleitung detektiert.

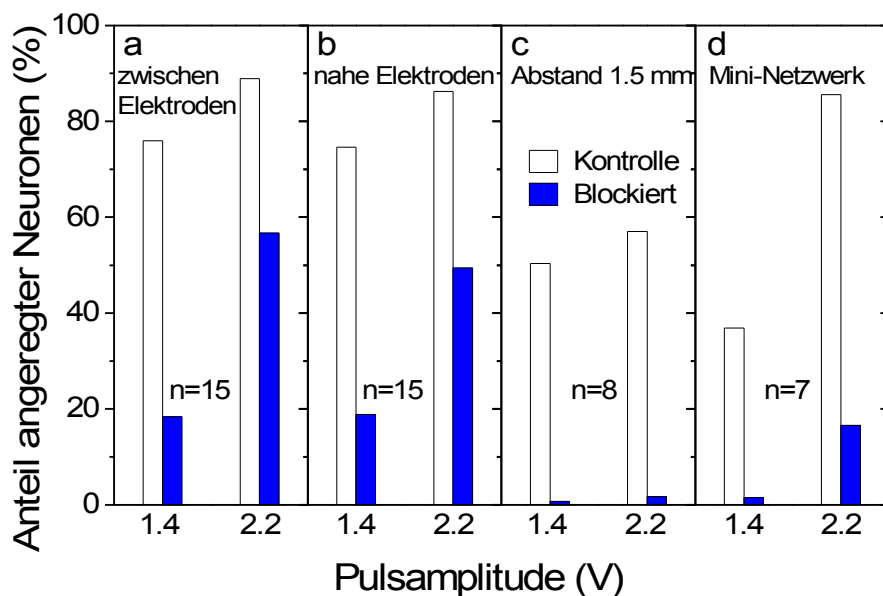


Abb. 5.21: Abhängigkeit der Anzahl stimulierter Neuronen des untersuchten Netzwerkes vor und nach Zugabe von APV, BMI, CNQX und PTX für herkömmliche Netzwerke (a, b), Netzwerke 1.5 mm entfernt von der Elektrode (c) und für Mini-Netzwerke (d), die Buchstaben a-d korrelieren zu denen in Abb. 5.19 (Normierung auf Gesamtzellzahl)

Mit diesen Experimenten können also die bereits vorhandenen experimentellen Hinweise [Wagenarr et al., 2004, Starovoytov et al., 2005] zur axonalen Stimulation für unsere Elektrodenstruktur verifiziert werden. Dies zeigt, dass mit den relativ einfachen Fingerelektroden komplexe Fragestellungen, wie z.B. den Anregungsmechanismus betreffend, untersucht werden können.

Abschließend werden die verschiedenen Netzwerkbereiche **a**, **b** und **d** stimuliert und verglichen, um Fragen der Netzwerkanregung zu beantworten. Die Anregung erfolgt erneut vor und nach Blockieren der synaptischen Transmission mit 10fach-Pulsen der Amplitude von ± 1.4 V und ± 2.2 V (Abb. 5.21). In allen Gebieten werden erwartungsgemäß Aktionspotentiale mit den verwendeten Pulsparametern ausgelöst, wobei die Effektivität der Pulse mit ± 1.4 V deutlich geringer ist als die mit höherer Amplitude analog zu bekannten Ergebnissen. Interessanterweise ist die Stimulation des Mini-Netzwerkes (vgl. Abb. 5.21 d) vor Zugabe von APV, BMI, CNQX und PTX genauso effektiv wie in den Kontrollregionen **a** und **b**. Nach der Zugabe der Antagonisten der Neurotransmitterrezeptoren ist nur noch eine axonale Stimulation möglich. Die Anzahl der direkt angeregten Neuronen im Fall **d** ist signifikant geringer als für die herkömmlichen Netzwerke **a** und **b**. Grund hierfür ist die geringere Anzahl der Axone, welche die Elektrodenkante und damit den Bereich der höchsten Potentialänderung überqueren. Die reduzierte Anzahl der Axone, die den Bereich höchster Potentialänderung durchlaufen, ist auf das nähere neuronale Umfeld zurückzuführen. Im Fall **a** und **b** verbinden sich die Neuronen isotrop mit ihren unmittelbaren Nachbarn, da in jeder Richtung annähernd gleich viele Zellen kontaktiert werden können. Die Neuronen des Mini-Netzwerkes jedoch finden nur in Richtung einer Halbebene, in einem großen Abstand zur Elektrode, Verbindungspartner. Die Anzahl der die Elektroden querenden Axone ist reduziert, da in diesem Bereich weniger Verbindungspartner zur Verfügung stehen. Aus der Anzahl axonal angeregter Neuronen des Mini-Netzwerkes ergibt sich weiterhin, dass bei einer Anregung von weniger als 20% der Gesamtneuronen eine synchrone Netzwerkaktivität erreicht wird.

5.1.4. Langzeitstimulation im Inkubator

In diesem letzten Abschnitt zu Stimulationsuntersuchungen an Neuronennetzwerken soll untersucht werden, ob durch die Einkopplung elektrischer Pulse die Zellmorphologie verändert werden kann. In dieser Versuchsreihe befinden sich die Neuronenkulturen im Inkubator bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und in dem Zellmedium DMEM. Gepulst werden die 12 Tage alte Kulturen zunächst alle 60 Sekunden mit einem biphasigen Einfachpuls der Pulsbreite $t_{PB}=1.5$ ms und der Amplitude $U=\pm 2.2$ V über einen Zeitraum

von 72 Stunden. Jeweils nach 24 Stunden Dauerstimulation wird eine Kulturschale entnommen und mit einer unstimulierten Schwesterkultur verglichen.

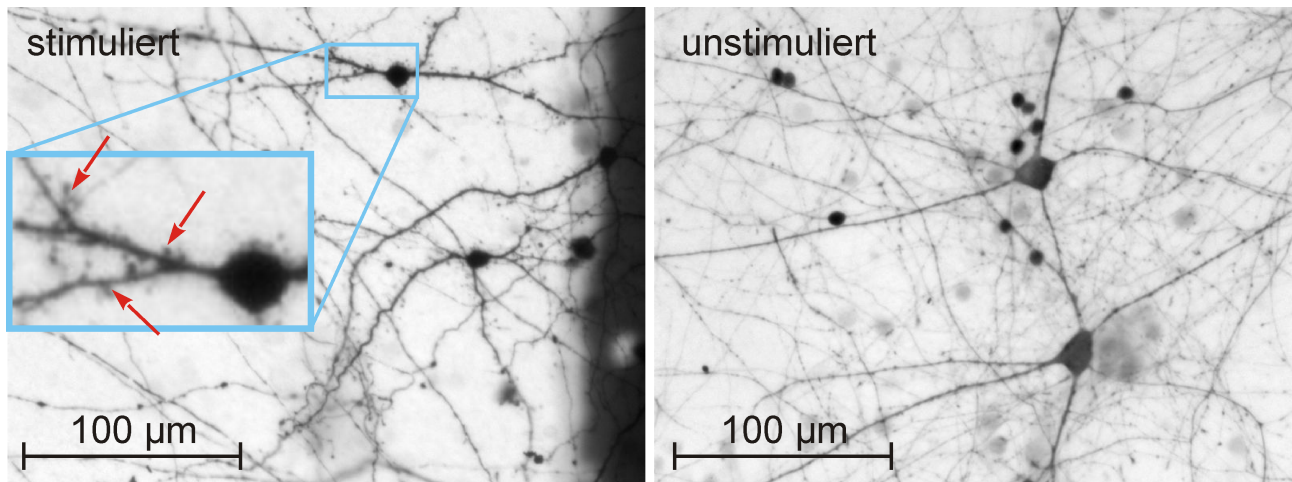


Abb. 5.22: Netzwerkmorphologie nach 72 h Stimulation (links). Es kommt zur Ausbildung von Filopodien (rote Pfeile), die in der unstimulierten Schwesterkultur (rechts) nicht auftreten (15 DIV), Stimulation mit Einfachpulsen alle 60 Sekunden ($U=\pm 2.2$ V, $t_{PB}=1.5$ ms)

Die Netzwerke, die 24 bzw. 48 Stunden stimuliert werden, zeigen keine Unterschiede zu den elektrisch nicht angeregten Kontrollkulturen (vgl. in Anhang Abb. 8.4, Abb. 8.5). Nach dreitägiger Stimulation konnten erste geringfügige Unterschiede beobachtet werden. So werden verstärkt Filopodien und Verästelungen beobachtet, die in Gebieten weit entfernt der Stimulationselektroden und in unstimulierten Netzwerken gleichen Alters nicht auftreten. Da die beobachteten Zellveränderungen lediglich ein Hinweis für einen stimulationsbedingten Einfluss sind, wird in einem zweiten Experiment gezielt versucht, die morphologischen Veränderungen zu verstärken. Falls die Stimulation die Zellfortsätze beeinflusst, wird bei einer erhöhten Anregungsfrequenz eine signifikante Veränderung

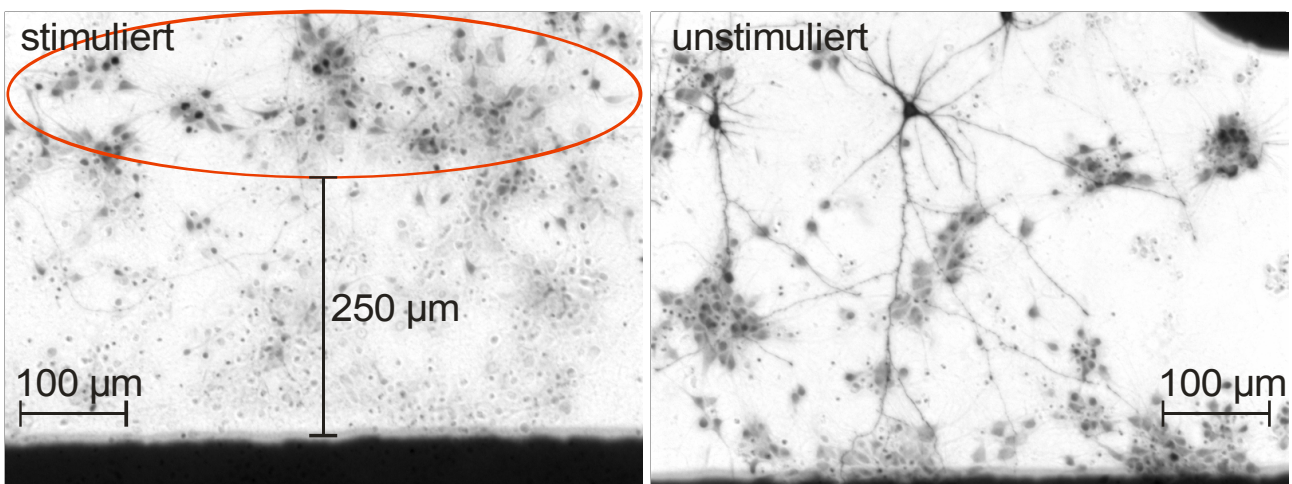


Abb. 5.23: 24h Dauerstimulation (links) mit einem Bereich von 300 µm abgestorbener Zellen, wobei die Ellipse lebende Zellen markiert, intaktes Netzwerk auf der unstimulierten Elektrodenseite (13 DIV), Stimulation mit Doppelpulsen alle 30 s ($U=\pm 2.2$ V, $t_{PB}=1$ ms)

5. Anregung von biologischen Systemen

erwartet. Die Netzwerke werden daher alle 30 s mit biphasigen Doppelpulsen der Amplitude $U = \pm 2.2 \text{ V}$ mit $t_{PB} = 1 \text{ ms}$ stimuliert.

Bereits nach 24 Stunden sind die Zellen über den Stimulationselektroden und in unmittelbarer Umgebung von 100-300 μm abgestorben. Da auf der unstimulierten Referenzseite hingegen das Netzwerk intakt ist, muss die Ursache des Zellsterbens die Stimulation sein. Wird die Stimulation auf 48 bzw 72 Stunden ausgedehnt, so vergrößert sich der Bereich der abgestorbener Zellen rund um die Stimulationselektrode. Nach 48 Stunden konnten erst in 1.6-1.8 mm Abstand zur Stimulationselektrode lebende Zellen detektiert werden. Auf Referenzseite scheint das Netzwerk intakt bei sehr geringer Zelldichte. Nach drei Tagen Dauerstimulation weitet sich der Bereich ohne Neuronen bis auf 2.6 mm aus, und die Zellanzahl auf der unstimulierten Referenzseite ist stark vermindert. Die Wiederholung der Dauerstimulation mit einem Doppelpuls im 30 Sekunden-Intervall führt zu dem gleichen Ergebnis, so dass die Zellschäden tatsächlich stimulationsbedingt sind. Die Ursache des toxischen Einflusses der Stimulation im Inkubator im Gegensatz zu den Experimenten bei Raumtemperatur kann der Temperaturunterschied sein. Bei einer höheren Temperatur reagiert die Zellmembran wesentlich empfindlicher auf mögliche induzierte Strömungen im Elektrolyten und ist anfälliger für Zellperforationen. Die verringerte Anzahl Neuronen zwischen den Elektrodenfingern der unstimulierten Seite wird nicht durch eine Ladungsakkumulation hervorgerufen. In einem Langzeitexperiment ohne Zellen wird auf einer Elektrodenseite mit einem 10fach-Puls ($U = \pm 2.2 \text{ V}$, $t_{PB} = 1 \text{ ms}$) alle 30 Sekunden stimuliert und dabei das Elektrodenpotential auf der Referenzseite mit einem Elektrometer gemessen. Nach Einsetzen der Stimulationpulse wird eine geringe Potentialänderung in Korrelation zu den Pulsen gemessen, eine Ladungsakkumulation findet jedoch nicht statt (Abb. 5.24).

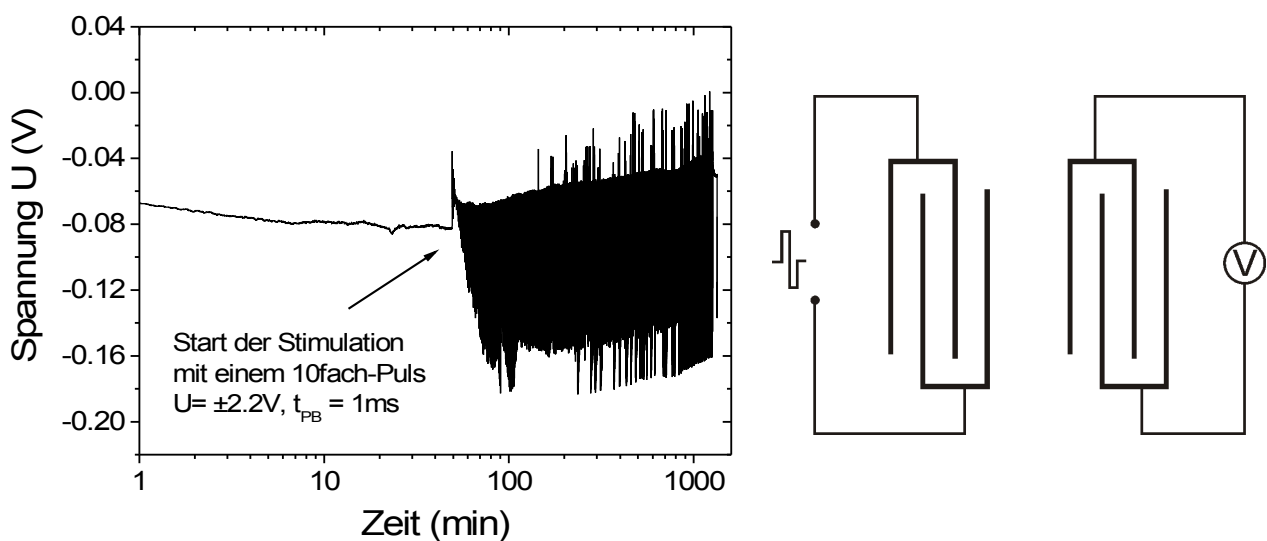


Abb. 5.24: Potentialmessung an der nicht stimulierten Elektrode zur Überprüfung einer durch elektrische Pulse ausgelösten Ladungsakkumulation

Stromspitzen, die ebenfalls zu Zellschäden führen, können mit einem digitalen Speicheroszilloskop und verschiedenen Schaltungen (vgl. Abb. 8.6-8.8) nicht nachgewiesen werden. Da die Zellschäden nur im Inkubator auftreten, kann eine temperaturabhängige Perforation der Zellmembran oder eine lokale Elektrolyse nicht ausgeschlossen werden.

5.1.5. Anregung mit Mikroelektroden

In diesem Kapitel werden die ersten Ergebnisse der Experimente der kombinierten Stimulations- und Ableitstruktur (vgl. Abb. 3.3 c) vorgestellt. Im Gegensatz zu der bisher verwendeten Struktur dienen hier zwei Einzelfinger als Stimulationselektroden. Zwischen diesen befinden sich 3x2 Ableitelektroden mit einem Durchmesser von 50 μm . Das Ziel ist es, die extrazelluläre neurale Aktivität zu detektieren, wobei die Zellsignale typischerweise eine Amplitude von ca. 50-100 μV aufweisen und Spitzenwerte bis 600 μV betragen können [Egert et al., 1998]. Trotz dieser im Vergleich zur Messtechnik relativ hohen Signale, ist eine Detektion aufgrund des biologischen Rauschens von 50 μV schwierig [Jah et al, 1999]. Da nach den theoretischen Betrachtungen eine mit Neuronen bedeckte Elektrode Grundlage für eine erfolgreiche Ableitung von Zellaktivität ist, werden selektiv nur mit Elektroden bedeckte Neuronen verwendet (vgl. Abb. 5.25).

Um Zellaktivität im Detektionszeitraum zu gewährleisten, soll die Neuronenkultur über die Stimulationselektroden angeregt werden, und anschließend die evozierte Aktivität sowohl mittels Ca^{2+} -Imaging als auch elektrisch aufgenommen werden.

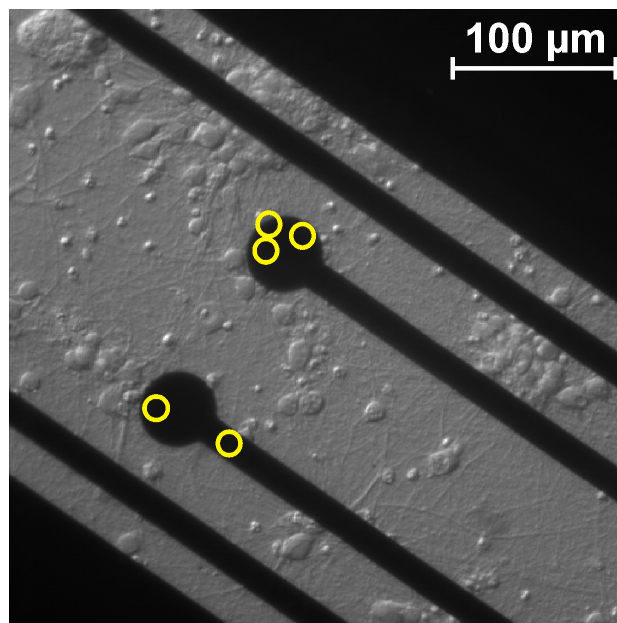


Abb. 5.25: Mikroskopische Aufnahme von zwei Ableitelektroden, die mit Neuronen bedeckt sind (13 DIV). Die gelben Kreise markieren die Zellen.

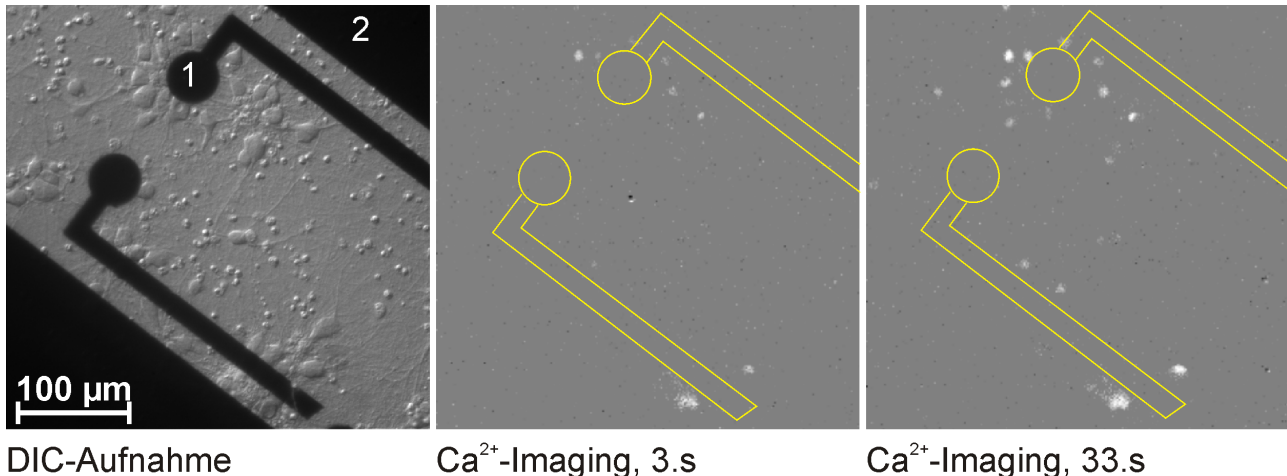


Abb. 5.26: Stimulation zwischen Ableit- (1) und Stimulationselektrode (2) mit einem Doppelpuls von $U=\pm 2.9$ V und mit Zellantwort in der 3. und 33. Sekunde

Bei der Anregung einer nicht blockierten Neuronenkultur, mit einem Doppelpuls von $U=\pm 2.2$ V mit $t_{PB}=1$ ms, über die Stimulationselektroden fällt auf, dass innerhalb der Stimulationselektroden keine Neuronen erregt werden. Ursache hierfür sind wahrscheinlich die Zuleitungen der Ableitelektroden, die abschirmend wirken. Der Potentialsprung an der Kante der Stimulationselektroden induziert eine lokale Depolarisation des Axons, die sich in Richtung des Somas ausbreitet. Überquert dabei das Axon eine erdfreie Zuleitung, die keinen Potentialunterschied zur Lösung aufweist, schreitet die Depolarisation nicht weiter voran, und es wird kein Aktionspotential ausgelöst. Außerhalb der Stimulationselektroden kann jedoch eine erfolgreiche Anregung beobachtet werden. Um die Abschirmung zu verhindern, wird der Stimulationspuls an eine Stimulationselektrode und eine Ableitelektrode angelegt. Nach einer Pulshöhenvariation stellt sich heraus, dass erst mit einer Amplitude von $U=\pm 2.9$ V eine Zellaktivität induziert werden kann (Abb. 5.26).

Zeitgleich zum Anregungspuls wird das Signal von Stimulations- und Ableitelektrode verstärkt und aufgenommen. Aufgrund des hohen Rauschens von ca. 20 mV kann jedoch kein Zellsignal detektiert werden (Abb. 5.27). Um mit der Elektrodenstruktur aus Abb. 3.3 c) Zellsignale detektieren zu können, müssen die Zuleitungen der Ableitelektroden isoliert, der Versuchsaufbau modifiziert und ein Probenhalter mit 8 Kontakten konzipiert werden. Durch eine Isolation der Zuleitungen wird zum einen das Rauschen verringert und zum anderen die Anregung der Neuronen zwischen den Stimulationselektroden möglich. Generell ist eine Detektion der extrazellulären Signale möglich, jedoch müsste der Versuchsaufbau in einem faradayschen Käfig aufgebaut und die provisorische Kontaktierung von Ableitelektroden und Verstärker verbessert werden. In weiterführenden Arbeiten sollen diese Modifikationen vorgenommen werden, um die Anwendungsmöglichkeiten der einfachen Elektrodenstrukturen zu erweitern.

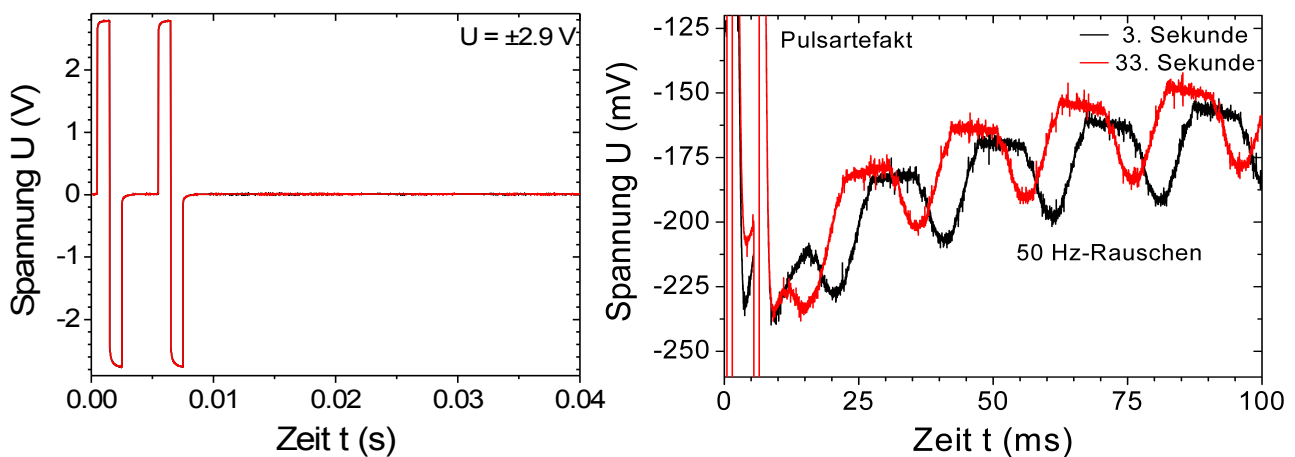


Abb. 5.27: Stimulationpuls (links) und detektiertes Signal, welches von Rauschen dominiert ist

5.2. Stimulation von Hefezellen

Um die Vielseitigkeit der Elektrode zu demonstrieren, wird zusätzlich zu den Neuronen ein weiteres, andersartiges biologisches System untersucht. Es wird das System der Hefezellen *Saccharomyces carlsbergensis* gewählt (vgl. Abb. 5.28), da die Hefezellen im Gegensatz zu den vernetzten Neuronenkulturen suspensiert vorliegen. Die Hefezellen besitzen intra- und extrazelluläre Membranen mit elektrochemischen Potentialgradienten, die empfindlich auf elektrische Pulse reagieren [Tomov und Tsoneva, 1988]. Eine Beeinflussung durch elektrische Felder ist daher aufgrund der ionenkonzentrationsgebundenen Transportsysteme der Zellmembran immer mit einer Änderung der Membranleitfähigkeit verbunden.

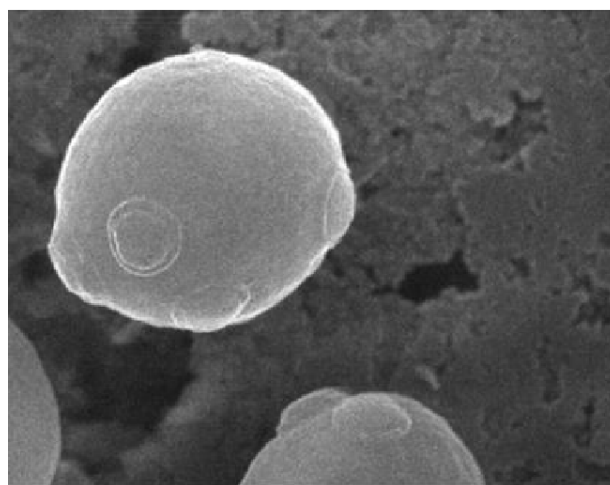


Abb. 5.28: REM-Aufnahme einer Hefezelle, *Saccharomyces carlsbergensis*, [Danø, 1999]

5. Anregung von biologischen Systemen

Mit der entwickelten Elektrodenstruktur werden also die Hefezellen stimuliert, um die oben genannten Effekte experimentell zu bestätigen. Die stimulationsbedingte Änderung der elektrochemischen Potentiale wird von den Hefezellen durch Aktivierung von energieverbrauchenden Ionenpumpen kompensiert. Durch Stoffwechselprozesse, beispielsweise Glykolyse, muss dann Energie in Form ATP nachgebildet werden. Da in einer gekoppelten Reaktion NADH, ein fluoreszierendes Molekül, gebildet wird (vgl. Abb. 2.15, Abb. 2.16), kann über die Analyse der NADH-Fluoreszenz die Beeinflussung der Hefezellen durch elektrische Pulse untersucht werden.

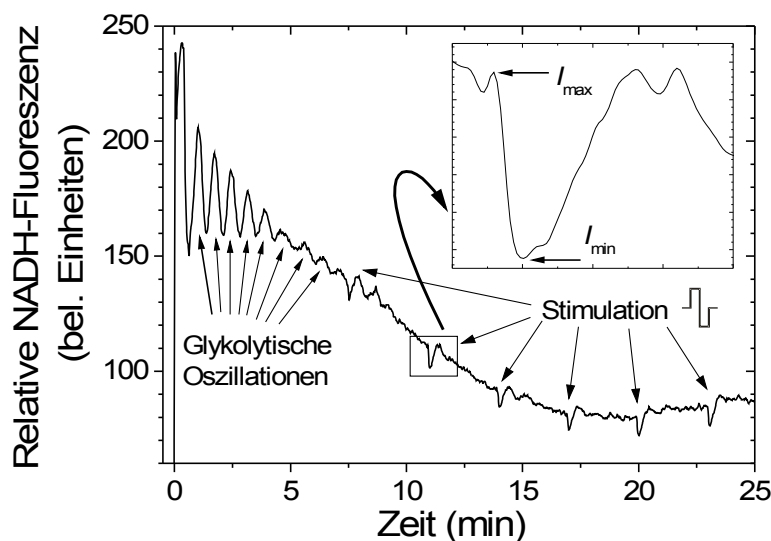


Abb. 5.29: Entwicklung der NADH Fluoreszenz während glykolytischer Oszillationen und nach elektrischer Stimulation. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt das Absinken der Fluoreszenz nach einem elektrischen Puls und indiziert die Punkte I_{\min} und I_{\max} , die für die Normierung der Intensität verwendet werden.

In Abb. 5.29 ist ein typischer Fluoreszenz-Verlauf von Hefezellen dargestellt, die sich in einem Energiezustand befinden, in der glykolytische Oszillationen nach Zugabe von Glukose beobachtet werden können. An die glykolytischen Oszillationen schließt sich ein Bereich leicht sinkender Fluoreszenz an, in der Stimulationspulse angelegt werden. Dabei bewirkt eine elektrische Stimulation bewirkt einen sofortigen Abfall der Fluoreszenz und einen langsamen Anstieg des NADH-Signals. Die Hefezellen benötigen ca. eine halbe Minute, um die NADH-Fluoreszenzänderung, ausgelöst durch den elektrischen Puls, zu kompensieren und den Fluoreszenzwert vor der Stimulation zu erreichen (Abb. 5.29, Ausschnittsvergrößerung). Mit Hilfe der Punkte I_{\max} und I_{\min} kann die Intensitätsänderung normiert ($\Delta I/I_{\max}$ mit $\Delta I = I_{\max} - I_{\min}$) und in Abhängigkeit verschiedener Pulsparameter aufgetragen werden. Da bei abgetöteten Hefezellen nach einer elektrischen Stimulation keine Fluoreszenzänderungen nachgewiesen werden können, ist die gemessene Fluoreszenzabnahme biologisch bedingt.

5.2.1. Bestimmung der Stimulationsparameter von Hefezellen

Um das Stimulationsfenster für eine signifikante Beeinflussung des Stoffwechsels, welches durch eine große NADH-Signaländerung ausgezeichnet ist, zu bestimmen, werden systematisch die Pulsbreite, die Flankensteilheit und die Pulsamplitude variiert. Da jedoch mehrere Zeitpunkte einer Stimulation möglich sind, z.B. während oder nach den glykolytischen Oszillationen, wird zunächst untersucht, in welchem Zeitfenster eine Stimulation die größte Intensitätsänderung im NADH-Signal auslöst. Dafür werden die Hefezellen in einem Zeitintervall von 90 Minuten jede zweite Minute mit einem biphasigen Puls mit einer Pulsbreite $t_{PB}=4\text{ ms}$ und einer Amplitude $U=\pm 10\text{ V}$ stimuliert (vgl. Abb. 5.30). Nur während dieses Experimentes wird die Sedimentationszeit der Hefezellen nicht eingehalten und direkt nach dem Befüllen der Versuchskammer mit der Stimulation begonnen. Im Zeitintervall I (0-25 Minuten) sedimentieren die Zellen, die Fluoreszenzintensität verringert sich, die glykolytischen Oszillationen setzen ein (Glukose-Zugabe bei $t=0$) und die elektrischen Eigenschaften des System verändern sich aufgrund der Bedeckung der Elektroden mit Hefezellen. Trotz dieser Effekte kann die Fluoreszenzänderung nach den Stimulationspulsen deutlich detektiert werden. Um Superpositionseffekte zu vermeiden und ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu gewährleisten, werden alle Stimulationsexperimente im II. Intervall (25-80 Minuten) durchgeführt. Das sich verringernde NADH-Signal bedeutet dabei, dass die in den Zellen vorhandene Energie abnimmt, was durch eine reduzierte Intensitätsänderung nach einer Stimulation charakterisiert wird. Die Änderung des NADH-Signals nach Anlegen eines Pulses ist schließlich so klein, dass nicht mehr zwi-

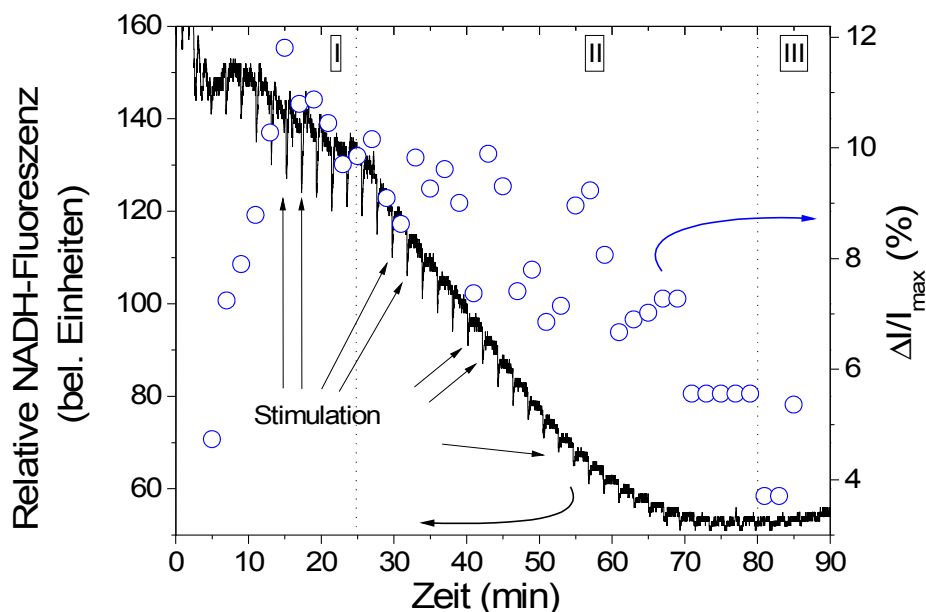


Abb. 5.30: Entwicklung der NADH-Fluoreszenz und der Intensitätsänderung über 90 Minuten mit einem Stimulationsabstand von 120 s

schen Rauschen und Stimulation unterschieden werden kann (Intervall III, ≥ 80 min).

Nachdem der Stimulationszeitraum feststeht, wird die Pulsbreite von 0.25 ms auf 10 ms erhöht, um das Stimulationsfenster einzugrenzen. Dabei kann für Pulsbreiten über 1 ms eine stimulationsinduzierte Verringerung des Fluoreszenzsignals detektiert werden (vgl. Abb. 5.31). Mit steigender Pulsbreite wird die Intensitätsänderung ausgeprägter, wobei für $t_{PB} \geq 10$ ms die Sättigung einsetzt. Da aber elektrolytische Effekte bei Pulsbreiten über 20 ms auftreten und die Intensitätsänderung bereits ab einer Pulsbreite von 4 ms sehr deutlich ist, wird dieser Wert für die weiteren Experimente gewählt.

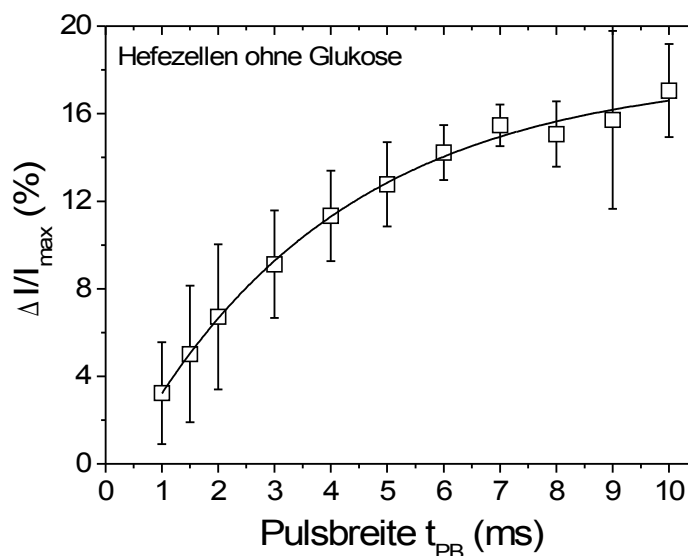


Abb. 5.31: Abhängigkeit des Intensitätsverhältnisses $\Delta I/I_{\max}$ von der Pulsbreite ($n=3$, $U=\pm 11$ V)

Bei Abhängigkeitsuntersuchungen des Intensitätsverhältnisses von der Flankensteilheit der Stimulationpulse zeigt sich, dass die Rechteckpulse mit einer Flankensteilheit von 2 ns eine wesentlich deutlichere Intensitätsänderung und damit eine Manipulation des Metabolismus hervorrufen als vergleichbare Dreieckspulse (vgl. Abb. 5.32).

Durch elektrische Pulse kann der Energiestoffwechsel von Hefekulturen verändert werden. Eine detaillierte Analyse des Einflusses von elektrischen Feldern kann durch die Stimulation von Hefezellen in zwei unterschiedlichen Energiezuständen untersucht werden. Nach der Ernte besitzen die Zellen relativ wenig ATP und befinden sich in einem energiearmen Zustand. Durch die Zugabe von Glukose wird durch Glykolyse Energie (ATP) gewonnen und die Zellen in einen energiereichen Zustand überführt. Beide Zellsysteme werden mit Pulsen unterschiedlicher Amplitude ($\pm 3 \text{ V} \leq U \leq \pm 11 \text{ V}$) stimuliert (vgl. Abb. 5.33). Ein Einfluss auf den Energiestoffwechsel in beiden Systemen kann erst für Amplituden $\geq \pm 5 \text{ V}$ detektiert werden. Interessanterweise zeigt sich, dass die Intensitätsänderung in dem System der energiearmen Hefezellen nach einem Stimulus immer ausgeprägter ist als in dem energiereichen System.

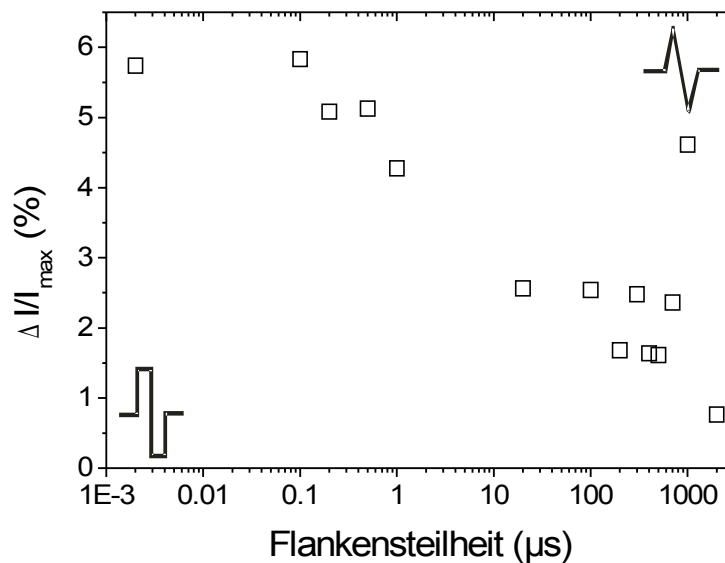


Abb. 5.32: Abhängigkeit des Intensitätsverhältnisses von der Flankensteilheit ($n=3$, $U=\pm 10$ V, $t_{PB}=4$ ms)

Ursache für das empfindliche Verhalten der Zellen ohne Glukose könnte das geringe ATP-Depot sein, was auf aktive Prozesse hindeutet, welche die elektrische Sensibilität der Zellen beeinflussen. Die vorgenommenen Stimulationsexperimente an Hefezellzellen indizieren, dass der Energiestoffwechsels, im speziellen die ATP-Produktion von Hefezellen, durch elektrische Felder beeinflusst werden kann. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung wurde bereits 1981 von einer Beeinflussung der ATP-Herstellung in Mitochondrien berichtet [Teissie et al., 1981]. Eine Sättigung der Intensitätsänderung für Hefezellen ohne Glukose, ähnlich wie für die energiereichen Zellen (mit Glukose), durch eine Erhöhung der

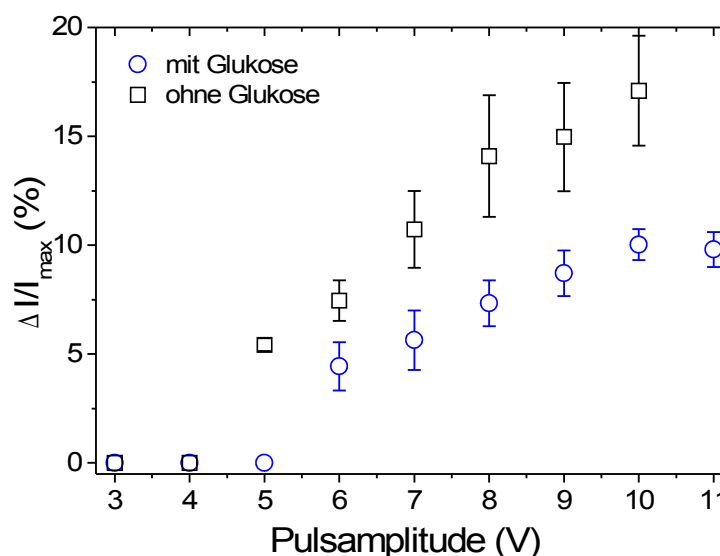


Abb. 5.33: Abhängigkeit des Intensitätsverhältnisses von der Pulsamplitude ($t_{PB}=4$ ms) für Hefezellen mit und ohne Glukose (jeweils $n=5$)

5. Anregung von biologischen Systemen

Pulsamplitude über ± 11 V ist nicht möglich, ohne elektrolytische Effekte zu verursachen, da ab ± 12 V eine Bläschenbildung einsetzt.

Eine Zellschädigung durch Elektroporation kann für Stimulationspulse mit $U = \pm 11$ V und einer Pulsbreite $t_{PB} = 4$ ms ausgeschlossen werden. In Anregungsversuchen mit Propidiumiodid [Deng et al., 2003] werden mit den gewählten Parametern nach 15-minütiger Stimulation bei einem Pulsintervall von 30 s keine signifikanten Zellveränderungen beobachtet. Die berechnete Feldstärke der entwickelten Fingerelektrode von $7500 \text{ V} \cdot \text{m}^{-1}$ ist im Vergleich zu den Feldstärken für eine Zellschädigung von $7.7 \cdot 10^5 \text{ V} \cdot \text{m}^{-1}$ bis $30 \cdot 10^5 \text{ V} \cdot \text{m}^{-1}$ zu gering [Jakob et al., 1981; Schrive et al., 2006]. Um Hysterese- oder Ermüdungseffekten während der Stimulation vorzubeugen, wird die Pulsamplitude, ausgehend von den hohen Werten, in 1 V-Schritten reduziert und wieder auf den Startwert erhöht.

Abschließend werden die Stimulationsergebnisse bzw. die Intensitätsänderungen in Abhängigkeit der durch die Pulse induzierten Ladung betrachtet. Dabei berechnet sich die Ladung, die durch den Puls induziert wird, nach Gl. (5.1) und ist das Produkt aus Pulsamplitude und -breite unter Beachtung der Flankensteilheit.

$$dQ = I dt = \frac{U}{Z} dt \quad I, U, Z \in \mathbb{C}$$

$$Q = \frac{1}{Z} \cdot \int U dt \quad (5.1)$$

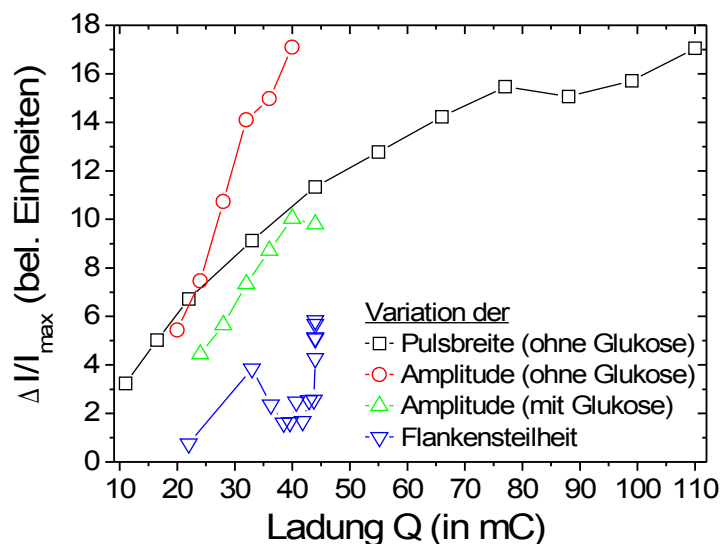


Abb. 5.34: Abhängigkeit der Intensitätsänderung von der induzierten Ladung

Die Berechnung der Ladung in den vorherigen Stimulationsexperimenten ermöglicht eine Analyse der Änderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit der parameterbedingten induzierten Ladungsmenge (vgl. Abb. 5.34). Es zeigt sich, dass die Erhöhung der Pulsbreite,

-höhe und der Flankensteilheit die induzierte Ladungsmenge vergrößern. Die bei der maximalen Pulsbreite von 10 ms induzierte Ladung ist etwa doppelt so hoch wie die bei maximaler Pulsamplitude. Interessanterweise ist die hervorgerufene Intensitätsänderung dabei gleich groß. Ursache für dieses Ergebnis kann eine zellbedingte Begrenzung des NADH-Gehaltes und damit eine maximale Intensitätsänderung sein, die bei Erreichen einer bestimmten Ladungsmenge möglich ist. Gegen diese Erklärung spricht, dass bei der induzierten Ladung von ca. 45 mC verschiedene Intensitätsänderungen detektiert werden. Trotz der Möglichkeit der direkten Beeinflussung des Stoffwechsels durch elektrische Pulse kann beispielsweise durch Sauerstoffzugabe ein ähnlicher Effekt erreicht werden [Winfree, 1972]. In Stimulationsexperimenten unter Verwendung eines sauerstoffempfindlichen Sensors wird dieses Gas nachgewiesen (Elektrolyse von Wasser), so dass eine sauerstoffbedingte Stoffwechselmanipulation nicht auszuschließen ist.

Die Experimente haben gezeigt, dass eine stoffwechselbeeinflussende Stimulation mit Pulsen einer Amplitude $\pm 5 \text{ V} \leq U \leq \pm 11 \text{ V}$, einer Pulsbreite von $\pm 1 \text{ ms} \leq t_{\text{PB}} \leq \pm 10 \text{ ms}$ und einer Flankensteilheit von 2 ns durchgeführt werden sollten. Ob die Beeinflussung dabei nur durch Ladungsinduktion oder indirekt auch durch elektrolytische Generation von Sauerstoff erfolgt, ist Schwerpunkt weiterführender Untersuchungen.

5.2.2. Detektion der glykolytischen Oszillationen

Neben der Stimulation sollen die entwickelten Elektroden für die elektrische Detektion von Oszillationen in Hefekulturen verwendet werden. Dabei soll die Aufnahme der glykolytischen Oszillationen von Hefezellen als ein Beispiel dienen, da deren oszillatorisches Verhalten während der Glykolyse im Detail, z.B. die Frequenz und die Phase betreffend, bekannt sind. Da die dielektrische Spektroskopie vielfältig, z.B. für die elektrische Analyse von Zellkonzentrationen [Carvell and Turner, 2003], verschiedenen Zelltypen [Suehiro et al., 2005] und hefezellbedingte Dispersionen [Asami and Yonezawa, 1996], eingesetzt wird, erscheinen Impedanzmessungen vielversprechend zur Analyse der Glykolyse-Oszillationen.

Aufgrund des oszillatorischen Verhaltens des ATP-Gehaltes während der Glykolyse, welches den Ionentransport durch die Zellmembran beeinflusst, ist von einer sich periodisch ändernden Leitfähigkeit innerhalb des Systems Zellen und Elektrolyt auszugehen. Um die erwarteten Leitfähigkeitsänderungen zu analysieren, werden parallel zu den Fluoreszenzmessungen Impedanzmessungen mit 10 kHz, korrespondierend zu dem unteren Frequenzbereich der β_1 -Dispersion der Zellmembran bzw. -wand [Asami and Yonezawa, 1996], durchgeführt. Die absoluten Widerstands- und Kapazitätssignale werden durch die

Sedimentation der Hefezellen dominiert, die drei bis fünf Größenordnungen über den oszillationsbedingten Leitfähigkeitsänderungen liegen. Um dennoch das oszillatorische Verhalten zu untersuchen, wird das sedimentationsbedingte Hintergrundsignal simuliert und von den Messgrößen subtrahiert, um die Oszillationen zu visualisieren. Die Oszillationen können bei der Untersuchung von Hefezellen nur im Widerstandssignal mit einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 7 dB identifiziert werden (vgl. Abb. 5.35 a). Im Kapazitätssignal wird aufgrund des geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses kein periodisches Verhalten detektiert.

Um diese Hypothese zu überprüfen, werden in einem Kontrollexperiment das Widerstands- und Kapazitätssignal von zell- und membranfreiem Hefeextrakt nach Trehalose-Zugabe aufgenommen. Durch die Verwendung von Hefeextrakt können membrangebundene Leitfähigkeitsänderungen ausgeschlossen werden. Trotz des Fehlens von Zellwänden können sowohl im korrigierten Widerstand- als auch im korrigierten Kapazitätssignal glykolyse-induzierte Oszillationen, mit einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 6 dB bzw. 7 dB, detektiert werden. Also können mit Impedanzmessungen bei 10 kHz die Änderungen der Leitfähigkeit bzw. der Dielektrizitätskonstanten des Mediums, wie von Asami und Yonezawa (1996) beschrieben, detektiert werden.

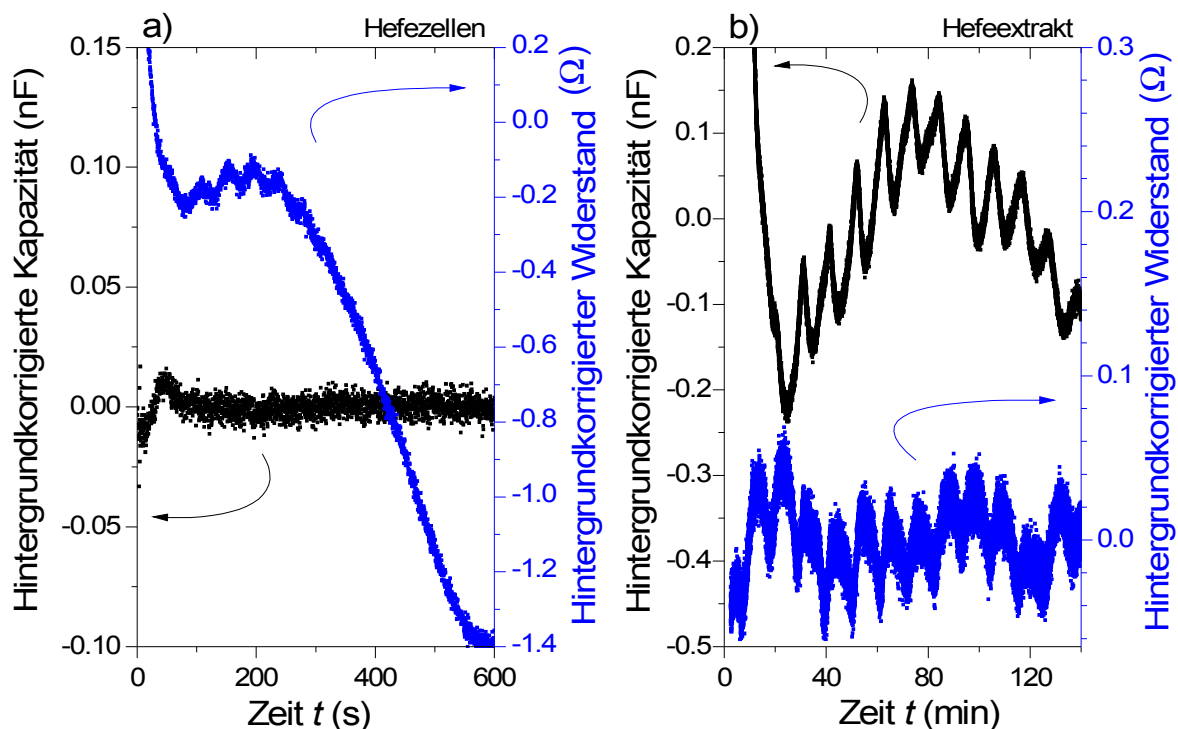


Abb. 5.35: Impedanzmessungen der glykolytischen Oszillationen von
a) Hefezellen und b) Hefeextrakt nach einer Hintergrundkorrektur

Der Vergleich der optischen und Widerstandsmessungen ergibt eine Phasendifferenz von 180° für Hefezellen (Abb. 5.36) und 50° für Hefeextrakt (Abb. 5.37). Dieses unterschied-

liche Verhalten korreliert mit den aus der Literatur bekannten Phasenbeziehungen der Zwischenprodukten der Glykolyse nach Zuckerzugabe sowohl in Hefeextrakt als auch in Hefezellen [Betz und Chance, 1965; Hess et al., 1969]. So existieren mindestens zwei Gruppen von Zwischenprodukte sowohl im oberen als auch im unteren Teil der Glykolyse, die eine Winkeldifferenz von 180° aufweisen. So oszillieren im unteren Teil der Glykolyse ATP und NADH um 180° phasenverschoben. Zusätzlich gibt es zwischen der oberen und unteren Glykolyse eine variable Phasenverschiebung.

Die Ergebnisse der Impedanzmessungen indizieren sowohl die feste als auch die zusätzliche Winkeldifferenz. Die Verschiebung von 180° ist zwischen dem Widerstands- und NADH-Fluoreszenzsignal von Hefezellen zu bestimmen. Im Fall von Hefeextrakt tritt die variable, hier 50° groß, Winkeldifferenz zwischen dem Widerstand und der NADH-Fluoreszenz auf. Dabei wird das unterschiedliche Verhalten von Hefezellen und Extrakt wie folgt interpretiert: Die Konzentrationsänderungen des ATP regulieren ATP-abhängigen K^+ -Kanäle in der Zellmembran von Hefezellen [Bertl et al., 1998], was zu ATP-abhängigen Änderungen der Membrankapazität und des -widerstandes führt. Diese periodischen Änderungen beeinflussen direkt die Impedanz des Systems Elektrolyt-Hefezellen. Da die periodischen Änderungen nur im Widerstandssignal auftreten, ist von einer dominierenden Oszillation der Membranleitfähigkeit auszugehen.

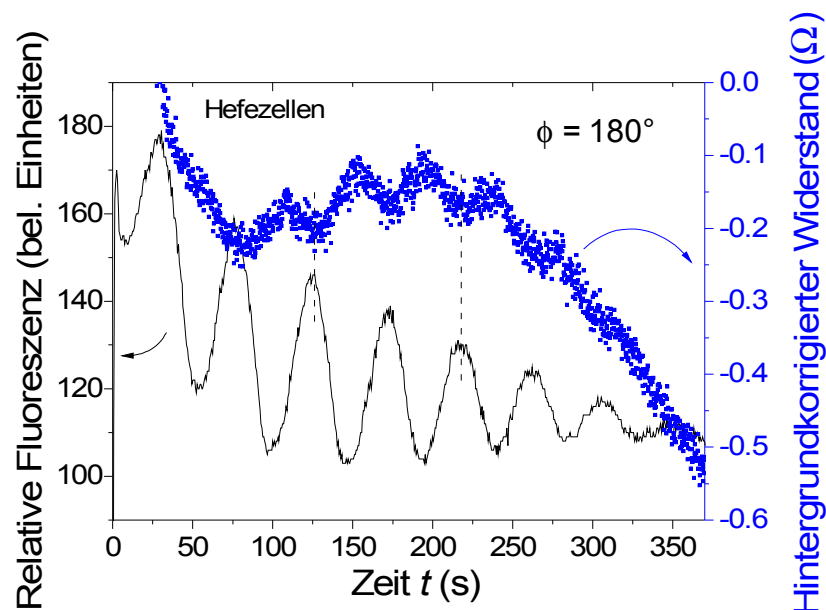


Abb. 5.36: Vergleich der optisch und elektrisch aufgenommenen glykolytischen Oszillationen von Hefezellen mit einer Periode von 45 s und einer Winkeldifferenz von $\phi = 180^\circ$

Da der Hefeextrakt frei von Zellmembranbestandteilen ist, können die detektierten Oszillationen nicht durch sich ändernde Eigenschaften der Membran ausgelöst werden. Ursache für die Oszillationen ist wahrscheinlich die periodische Konzentrationsänderung

von Ionen und Dipolen der glykolytischen Edukte und Produkte, die sowohl die Kapazität als auch den Widerstand des Gesamtsystems beeinflussen. Bekannterweise oszillieren Konzentrationen der Zuckerphosphate in beiden Abschnitten der Glykolyse, im oberen Teil jedoch mit höherer Amplitude. Die Winkeldifferenz von 50° kann mit der variablen Phasenverschiebung zwischen dem oberen und dem unteren Glykolyseabschnitt [Hess et al., 1969] erklärt werden und bestätigt die Annahme, dass die Konzentrationsänderungen, speziell der Zuckerphosphate, mittels Impedanzmessungen detektiert werden.

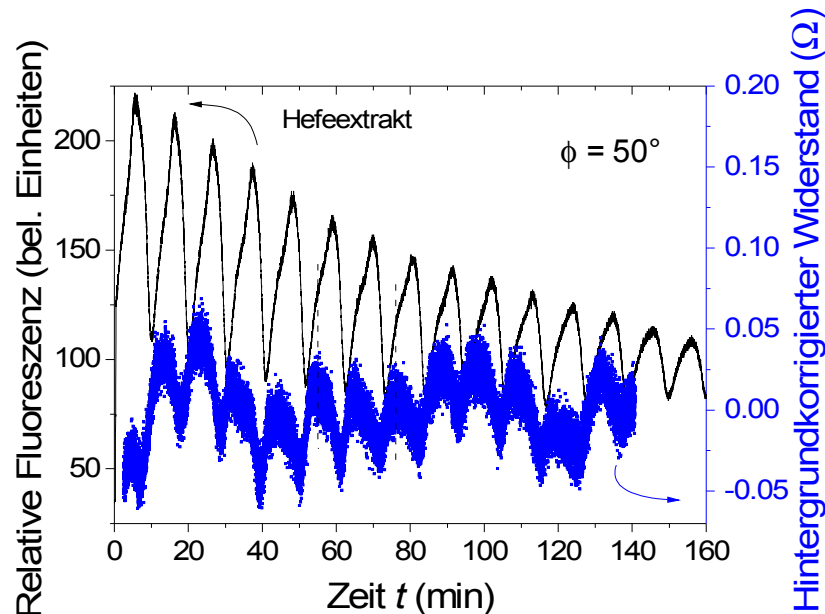


Abb. 5.37: Vergleich der optisch und elektrisch aufgenommenen glykolytischen Oszillationen von Hefeextrakt mit einer Periode von 11 min und einer Winkeldifferenz von $\phi = 50^\circ$

Mit einer abschließenden Fourier-Transformation der optischen und elektrischen Signale der Hefezellen und des Hefeextrakt werden die Oszillationsfrequenzen bestimmt (Abb. 5.38). Für die Hefezellen ergeben sich sowohl für das NADH- als auch das Widerstandssignal eine Frequenz von $f = 0.022$ Hz, was einer Periode von 45 s entspricht und sehr gut mit den Werten der Literatur (>30 s [Betz und Chance, 1965] bzw. 40 s [Richard et al., 1996]) übereinstimmt. Nach der Transformation der Messwerte des Hefeextrakts kann eine Periode der glykolytischen Oszillationen von 11 Minuten ($f = 0.0016$ Hz), in Übereinstimmung mit bekannten Werten (13 min [Mair et al., 2006] und 8.6 min [Hess et al., 1969], bestimmt werden.

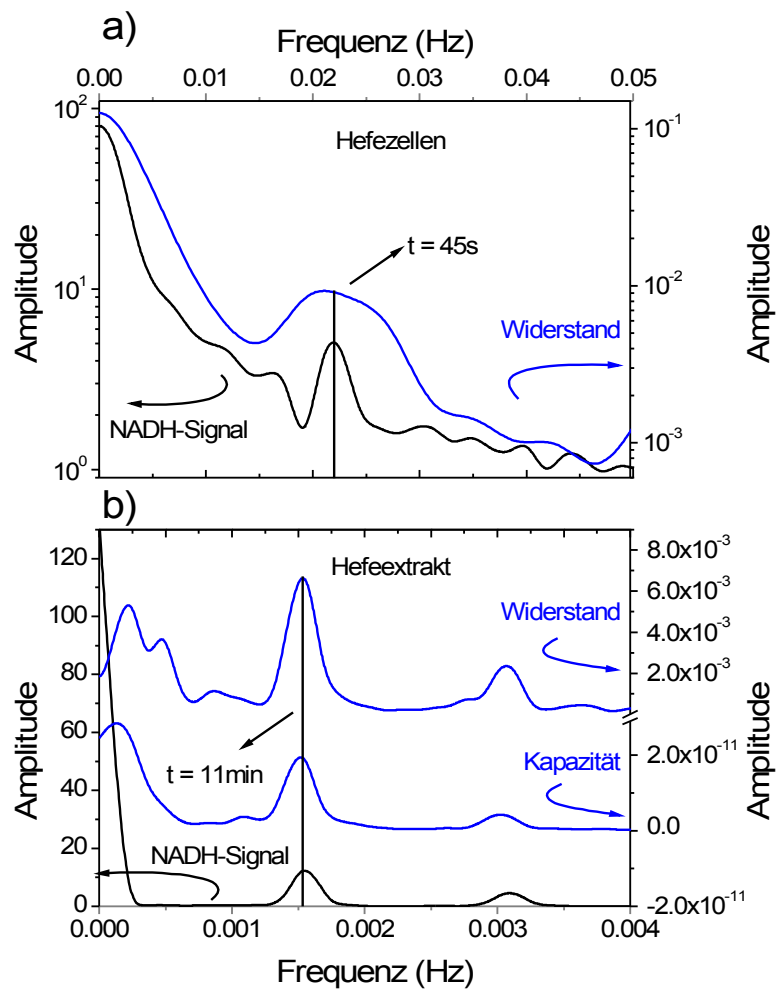


Abb. 5.38: Fourier-Transformation der optischen und elektrischen Oszillationen von Hefezellen a) und Hefeextrakt b)

5.3. Untersuchungen zur Bioverträglichkeit

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Entwicklung von einfachen planaren Elektrodenstrukturen zur Stimulation von lebenden Zellen *in vitro*. Die Verwendbarkeit der 2d-Elektroden ist jedoch begrenzt und gerade für Implantationszwecke in Tieren nicht geeignet. Aus diesem Grund wird versucht ein alternatives Materialsystem zu finden, mit dem Ableit- und Stimulationsversuche *in vivo* möglich sind. Da gerade GaN-basierte Halbleiterbauelemente vielversprechend für die Anregung von Herzzellen und Detektion der Zellsignale sind [Steinhoff et al., 2005], werden GaN- und AlGaN-Schichten auf ihre Bioverträglichkeit untersucht. In einem ersten Schritt werden dabei Neuronen auf die Halbleiterschichten plattiert und 14 Tage im Inkubator kultiviert.

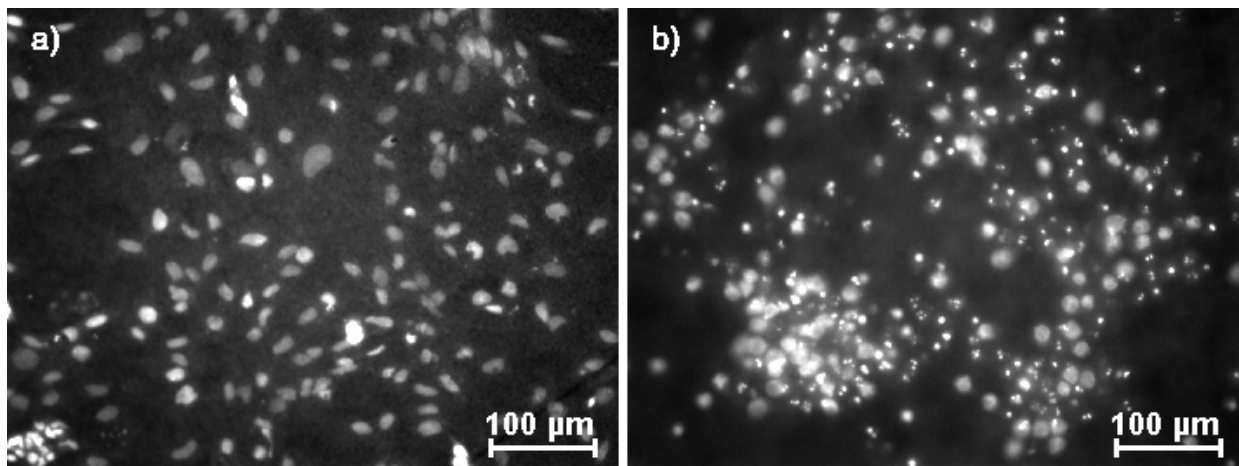


Abb. 5.39: Ungestörte Ausbildung von Neuronennetzwerken auf Halbleiteroberflächen
a) AlGaN-Oberfläche, b) GaN-Oberfläche nach 14 DIV (DAPI-Färbung)

Das Netzwerk bildet sich ungestört aus, und es treten weder im Fall von AlGaN noch bei GaN toxische Reaktionen oder andere Zellveränderungen auf (vgl. Abb. 5.39). Da bei dissoziierten Netzwerken kein Einfluss der Halbleitermaterialien festgestellt wird, kann mit Implantationsversuchen in mongolischen Wüstenrennmäusen (Gerbils) begonnen werden. Drei adulten Tieren werden jeweils eine GaN-Schicht auf Silizium(111) und ein Stück PtIr-Draht für 4 Wochen implantiert. Der PtIr-Draht dient dabei als Referenzprobe, bei der keine toxischen Reaktionen auftreten, sondern nur eine Glia-Narbe beobachtet wird. Nach Ende des Versuchszeitraums werden die Proben explantiert, 50 µm dünne Hirnschnitte angefertigt und mit Kresylviolettacetat (0.5%, Firma Aldrich) gefärbt (Nissl-Färbung). Da der Farbstoff sich an basophile Verbindungen wie RNA und DNA anlagert, werden die Somata blau bzw. violett gefärbt. Mit dieser Methode können nur toxische und starke Gewebereaktionen detektiert werden, was jedoch für erste Biokompatibilitätsversuche hinreichend ist.

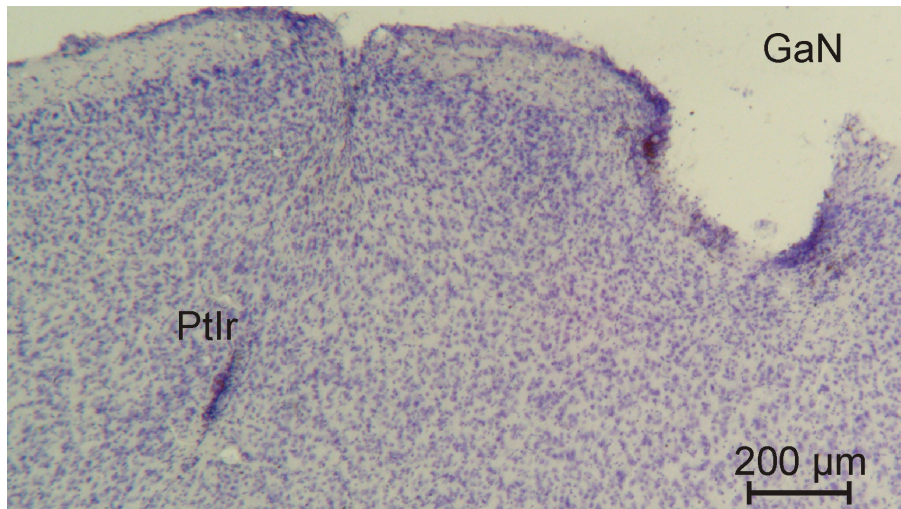


Abb. 5.40: Nissl-Färbung eines Hirnschnittes nach vierwöchiger Implantation von GaN und PtIr bei Ausbildung einer Glia-Narbe um die Implantate ohne Entzündungsreaktionen

Bei der Analyse der Nissl-Färbung des Kortex im Bereich der Implantate kann keine Entzündungsreaktion beobachtet werden (vgl. Abb. 5.40). Die nach einer Implantation auftretende charakteristische Bildung von einer Glia-Narbe ist in beiden Gebieten zu erkennen. Dabei kann anhand der Glia-Vernarbung nicht zwischen der Zellschädigung von PtIr und GaN unterschieden werden. Der geschädigte Bereich um das GaN-Implantat ist aufgrund des größeren Probenstückes ausgedehnter. Während der Implantationszeit von 4 Wochen zeigte keines der Gerbils Verhaltensauffälligkeiten, so dass von einer Bioverträglichkeit von GaN ausgegangen werden kann.

Nach der Explantation wird die GaN-Schicht unter dem Mikroskop auf Oberflächenschäden untersucht. Nach einer Reinigung in Azeton befinden sich noch stark anhaftende Zellrückstände auf dem GaN, die erst mit Piranha $\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{H}_2\text{O}_2 : \text{H}_2\text{O}$ (4:1:1) entfernt

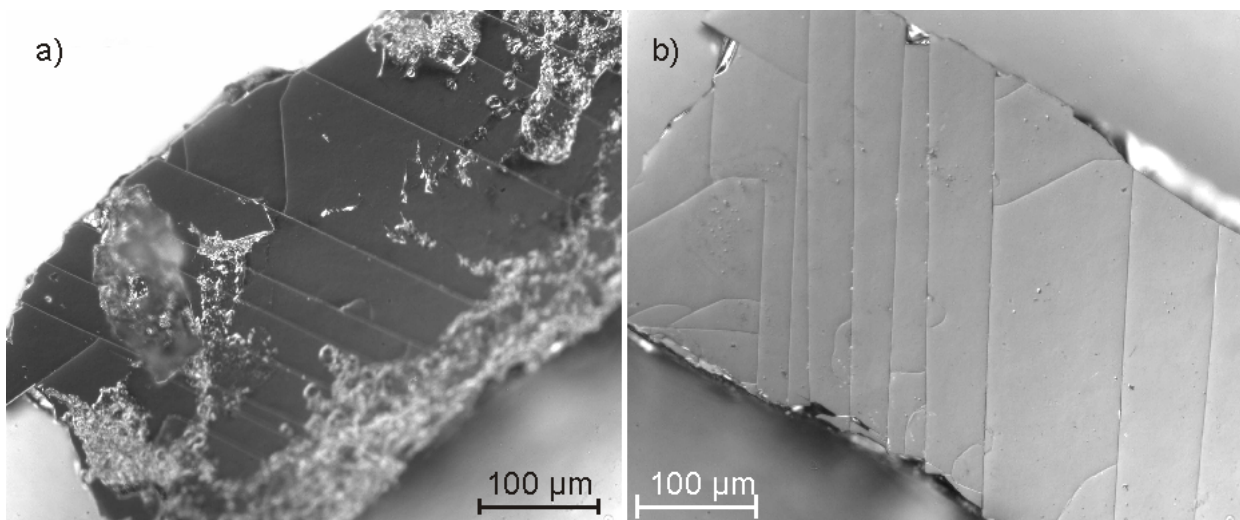


Abb. 5.41: Mikroskopische Aufnahme einer 4 Wochen implantierten GaN-Schicht, a) mit Zellrückständen, b) nach dem Ätzen mit Piranha ($\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{H}_2\text{O}_2 : \text{H}_2\text{O}$; 4:1:1)

5. Anregung von biologischen Systemen

werden können. Auf der freigeätzten GaN-Oberfläche sind keine mikroskopisch sichtbaren Schädigungen erkennbar. Weiterführende Untersuchungen zur elektrischen Charakterisierung der Oberflächen sollen bei einer ausführlichen Versuchsreihe mit AlGaN, AlN, SiN, InGaN und InN durchgeführt werden. Die Silizium-Rückseite der GaN-Probe weist jedoch starke Degradationsspuren (Abb. 5.42) auf.

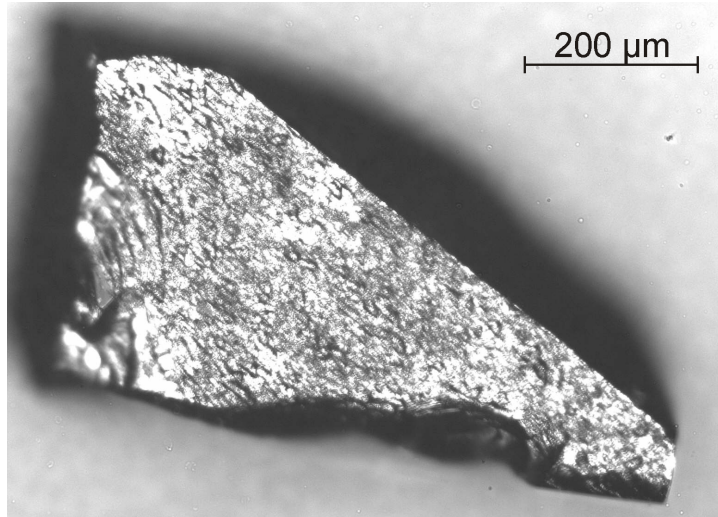
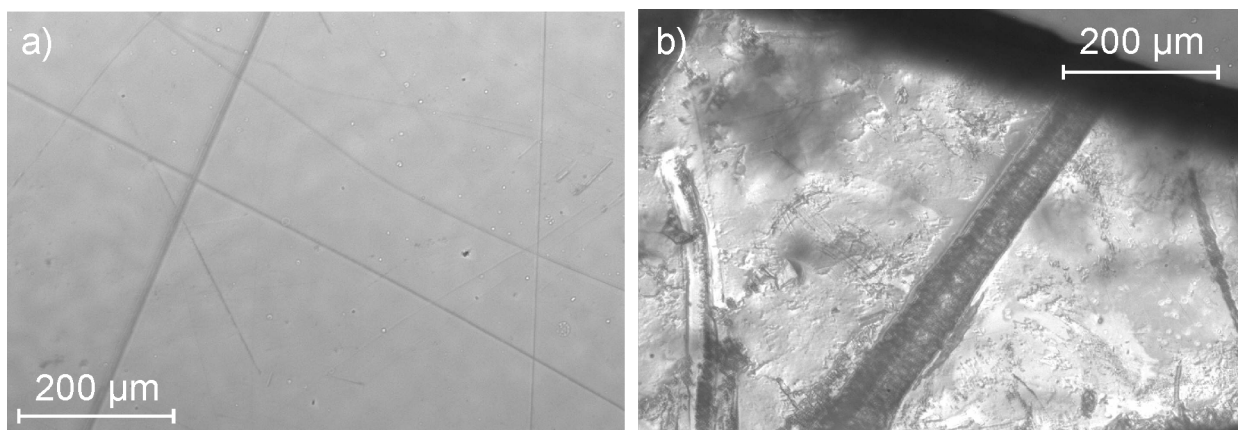


Abb. 5.42: Mikroskopische Aufnahme einer 4 Wochen implantierten Silizium-Schicht

Vor der Implantation von Bauelementen, z.B. GaN-basierten Transistoren, sollte daher das Silizium-Substrat entfernt werden. Da das Hirngewebe sehr empfindlich auf eine Temperaturerhöhung reagiert, muss die Verlustleistung der implantierten Transistoren möglichst Null sein. Durch eine gute Isolation der Transistoren können temperaturbedingte Zellschäden vermieden werden. Die für die Isolation von Bauelementen gebräuchlichen Polymide müssen daher auf ihre Bioverträglichkeit getestet werden.



*Abb. 5.43: Mikroskopische Aufnahmen einer Polymidoberfläche,
a) vor der Implantation: glatte Schicht mit einzelnen Gräben,
b) nach vierwöchiger Implantation: tiefe Gräben und rauhe Oberfläche*

Daher werden zwei verschiedene Polymide in der o.g. Präparation ebenfalls in drei adulte Gerbils implantiert. Da sich auch hier nur die für Operationsverletzungen typische Glia-Narbe ausbildet, scheinen die Polymide biokompatibel zu sein. Bei dem Vergleich der explantierten Polymid-Proben mit dem Ausgangsmaterial fällt auf, dass die Oberfläche des Polymids beschädigt und teilweise aufgelöst ist (Abb. 5.43). Bevor fertig prozessierte Bauelemente zur Detektion von Zellsignalen oder zur Stimulation *in vivo* eingesetzt werden, muss gewährleistet sein, dass die Isolationsmaterialien inert gegenüber den chemischen Einflüssen des Gehirns sind. Eine mögliche Alternative könnten Photolacke sein, da diese bei Glia-Zellen keine toxischen Reaktionen hervorrufen (vgl. Abb. 3.5).

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Realisierung einer einfachen, kostengünstigen und biologisch vielfältig einsetzbaren Stimulationselektrode, mit der an verschiedenen Zellkulturen wissenschaftlich interessante Fragestellungen untersucht werden können.

Unter Berücksichtigung der zwingend erforderlichen Eigenschaften der optischen Transparenz, der elektrischen Leitfähigkeit, der Bioverträglichkeit und der Spannungsfestigkeit mussten dazu Elektroden konzipiert werden, die in Zellkulturen verwendet werden können. Für die Stimulation von neuronalen *in vitro*-Netzwerken musste die Elektrode so integriert werden, dass die Netzwerkmorphologie nicht beeinflusst wird. Aus diesem Grund wurden planare, zweidimensionale Elektroden entwickelt, die direkt auf den standardmäßig verwendeten Deckgläsern der Neuronenpräparation abgeschieden werden. In Vorversuchen wurden die Metallelektroden mittels Sputterdeposition auf den Deckgläsern aufgebracht, wobei nur bei Verwendung einer zusätzlichen Haftschicht die Netzwerke unfaszikuliert auswachsen. Aufgrund der an der Zellkultur durchzuführenden Standarduntersuchungsmethoden mittels Durchlichtmikroskopie musste der Elektrodenaufbau so dimensioniert werden, dass eine optische Transmission gewährleistet war. Da die dünnsten, durch Sputterdeposition herzustellenden Schichten jedoch keine signifikante optische Transparenz aufwiesen, wurden alle folgenden Elektrodenstrukturen ausschließlich mittels Elektronenstrahlverdampfen abgeschieden. Hinsichtlich der Homogenität der elektrischen Eigenschaften der Elektrode war eine geschlossene Oberfläche anzustreben. Toxische Wechselwirkungen wurden durch die Verwendung der bioverträglichen Metalle Titan, als Haftschichtmaterial, und Gold, als Elektrodenmaterial, ausgeschlossen. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte wurde eine 5 nm dünne Titan-Haftschicht und eine 50 nm dünne Gold-Deckschicht als der optimale Schichtaufbau bestimmt. Die für eine Depolarisation der Zellmembran notwendige Feldstärke konnte unter Ausschluss von irreversiblen, elektrolytischen Effekten durch eine ineinandergreifende Elektrodenstruktur mit einem nominellen Abstand der Einzelelektroden von 300 μm erreicht werden. Der Bahnwiderstand einer Elektrode wurde dabei reproduzierbar kleiner als 50 Ω bestimmt.

Das elektrische Verhalten des Systems, bestehend aus Elektroden, Elektrolyt und Zellen, wurde für Gleich- und Wechselspannungen frequenzabhängig analysiert. Mit Hilfe eines sukzessiv optimierten Ersatzschaltbildes konnten die Impedanzmessungen modelliert und Wechselwirkungsvorgänge charakterisiert werden. Durch die Kombination von R-C-Gliedern konnte zudem das Frequenzverhalten der Elektroden unter Berücksichtigung der Strompfade in sehr guter Näherung beschrieben werden. Durch Hinzufügen der Elektrolyten aCSF und KH_2PO_4 wurden die elektrischen Eigenschaften des Systems signifikant verändert. Insbesondere erhöhten die freibeweglichen Ladungsträger deutlich die Leitfähigkeit des Gesamtsystems. Erst unter Berücksichtigung der frequenzabhängigen, sich zwischen Metalloberfläche und Elektrolyt ausbildenden Doppelschicht in Kombination mit R-C-Gliedern war eine Simulation der Impedanzmessungen möglich. Lediglich bei der Modellierung der Impedanz von Phosphatpuffer und Elektroden zeigten sich für Frequenzen >10 kHz Abweichungen von den Messwerten. Bei der Betrachtung des Systems mit Neuronen wurde keine Veränderung der elektrischen Eigenschaften beobachtet. Ursache dafür ist der geringe additive Anteil der Membrankapazitäten bzw. -widerstände des zweidimensionalen Netzwerkes im Vergleich zum Elektrolytvolumen. Die Zugabe von suspensierten Hefezellen (ca. ein Drittel des Volumens) führte zu zusätzlich auftretenden α - und β_1 -Dispersionen, die charakteristisch für Hefezellen sind.

Nach der Entwicklung sowie der elektrischen Charakterisierung der Elektroden wurde deren Anwendbarkeit an zwei verschiedenen biologischen Systemen, dissoziierten Neuronennetzwerken und Hefezellen, getestet. Die Stimulationsparameter für eine hohe Anregungseffizienz wurden für beide Zellsysteme durch Variation der Pulsbreite, der Pulsamplitude und der Flankensteilheit bestimmt.

Eine synchrone Netzwerkanregung der dissoziierten Neuronenkulturen konnte durch Anlegen eines biphasigen, rechteckigen Doppelpulses der Amplitude ± 2.2 V und der Pulsbreite $t_{\text{PB}}=1$ ms erreicht werden. Die beobachtete Aktivität setzte sich dabei kumulativ aus direkt stimulierten und durch synaptische Transmission angeregten Zellen zusammen. Da für Untersuchungen des Anregungsmechanismus nur die direkt stimulierten Neuronen eine Relevanz besitzen, wurden die Glutamat- und GABA_A -Neurotransmitterrezeptoren chemisch blockiert. Um eine vergleichbare Resonanz wie in nichtblockierten Kontrollkulturen nach einem Stimulus zu erhalten, musste mit einem 10fach Puls der Amplitude ± 2.2 V angeregt werden. Durch spezielle Präparationstechniken wurden Netzwerkbereiche mit unterschiedlicher Axondichte entlang der Elektrodenkanten generiert. Da lokale Potentialmessungen übereinstimmend für Gleich- und Wechselspannung den höchsten Gradienten an den Elektrodenkanten bestimmten, ist hier die größte Anregungseffizienz zu erwarten. Mit Hilfe von Netzwerkbereichen, die 1.5 mm entfernt von den Elektroden platziert werden, konnte eine axonale Anregung (antidrome Stimulation) in dissoziierten Kulturen nachgewiesen werden. Die Anregungseffizienz nach einem Stimulus korrelierte

dabei direkt mit der Axondichte über den Elektrodenkanten. Durch einen Vergleich mit unstrukturierten Kontrollkulturen zeigte sich, dass eine elektrische Direktanregung von weniger als 20% der Gesamtneuronen hinreichend für das Auslösen von synchroner Netzwerkaktivität war.

Kritisch muss angemerkt werden, dass die Empfindlichkeit des Ca^{2+} -Imaging zur Detektion von neuraler Aktivität nicht ausreicht, um einzelne Aktionspotentiale zu messen. Bei der direkten Ableitung von Zellsignalen zeigte sich, dass bereits mit Pulsen $< \pm 1$ V Aktionspotentiale ausgelöst werden konnten. Da der Untersuchungsschwerpunkt jedoch nicht die Bestimmung des Schwellwertes zum Auslösens von Zellaktivität war und bei höheren Amplituden keine Schädigung der Neuronen auftrat, ist dieser Aspekt bei der Bestimmung des Anregungsmechanismus irrelevant.

Zusätzlich zu den Stimulationsversuchen in Neuronen wurde die Elektrode verwendet, um den Energiestoffwechsel von Hefezellen zu manipulieren. Übereinstimmend mit Beobachtungen an Mitochondrien [Teissie et al., 1981] konnte gezeigt werden, dass elektrische Felder den ATP-Gehalt beeinflussen. Dabei wurde eine signifikante Veränderung der NADH-Fluoreszenz und damit des Stoffwechsels für einzelne biphasige Rechteckpulse der Amplitude ± 11 V und Pulsbreite $t_{PB}=4$ ms erreicht. Während der Stimulation wurde mit einem Gassensor elektrolytisch entstandener Sauerstoff detektiert, der ebenfalls die Stoffwechselprozesse von Hefen beeinflusst [Winfree, 1972]. Daher konnte nicht zwischen einer direkten Beeinflussung des Stoffwechsels durch elektrische Felder und einer indirekten durch Sauerstoffgeneration unterschieden werden.

Neben der Einkopplung von elektrischen Feldern in lebende Zellen konnten mit der entwickelten Elektrode die glykolytischen Oszillationen von Hefezellen und von Hefeextrakt detektiert werden. Dabei ergaben die Analyse der Impedanzmessungen und der optischen NADH-Messungen übereinstimmend eine Oszillationsperiode für Hefezellen (45 s) bzw. Hefeextrakt (11 min). Bei Hefezellen resultierten die glykolysebedingten Konzentrationsänderungen von ATP in einer periodischen Veränderung der Systemimpedanz, die auf Variationen der Membranleitfähigkeit zurückzuführen waren. Bei Hefeextrakt, das frei von Zellmembranbestandteilen ist, wurden die mit Impedanzmessungen detektierten Oszillationen den Konzentrationsänderungen von Zuckerphosphaten zugeordnet.

Aufgrund der zweidimensionalen Struktur war die entwickelte Elektrode nicht für *in vivo*-Untersuchungen geeignet. Halbleitermaterialien mit einer chemisch inerten Oberfläche erscheinen vielsprechend für Anwendungen im Gehirn. Da nach einer vierwöchigen Implantationszeit weder GaN noch AlGaN toxische Reaktion hervorriefen, können mit diesen Halbleitern Transistoren zur Untersuchung von Hirnaktivität hergestellt werden.

7. Literatur

- Aoyagi, Y., Stein, R.B., Branner, A., Pearson, K.G. und Normann, R.A. (2003), Capabilities of a penetrating microelectrode array for recording single units in dorsal root ganglia of the cat, *J. Neurosci. Meth.* **128**, 9–20
- Asami, K., Hanai, T. und Koizumi, N. (1977), Dielectric Properties of Yeast Cells: Effect of Some Ionic Detergents on the Plasma Membranes, *J. Membrane Biol.* **34**, 145–156
- Asami, K. und Yonezawa, T. (1996), Dielectric Behavior of Wild-Type Yeast and Vacuole-Deficient Mutant Over a Frequency Range of 10 kHz to 10 GHz, *Biophys. J.* **71**, 2192–2200
- Asami, K., Gheorghiu, E., und Yonezawa, T. (1999), Real-Time Monitoring of Yeast Cell Division by Dielectric Spectroscopy, *Biophys. J.* **76**, 3345–3348
- Asami, K. (2002), Characterization of biological cells by dielectric spectroscopy, *J. Non-Crystal. Solids* **305**, 268–277
- Averin, S. Sachot, R., Hugi, J., de Fays, M. und Ilegems, M. (1996), Two-dimensional device modeling and analysis of GaInAs metal–semiconductor–metal photodiode structures, *J. Appl. Phys.* **80**, 1553–1558
- Bard, A.J., Parson R. und Jordan J. (1985), Standard potentials in aqueous solution, IUPAC (Marcel Dekker), New York
- Bard, A.J. und Faulkner, L.R. (2001), Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications, 2nd Edition, John Wiley&Sons, New York
- Barrington, J.W., Dyer, R. und Bano, F. (2005), Bladder augmentation using Pelvicol™ implant for intractable overactive bladder syndrome, *Int. Urogynecol. J.* **17**, 50–53
- Bearzotti, A., Foglietti, V., Polzonetti, G., Iucci, G., Furlani, A. und Russo, M.V. (1996), Investigations on the response to humidity of an interdigitated electrode structure coated with iodine doped polyphenylacetylene, *Mat. Sci. Eng. B* **40**, 1–4

- Bertl, A., Bihler, H., Reid, J.D., Kettner, C. und Slayman, C.L. (1998), Physiological characterization of the yeast plasma membrane outward rectifying K⁺ channel, DUK1 (TOK1), in situ, *J. Membrane Bio.* **162**, 67-80
- Betz, A. und Chance, B. (1965), Phase relationship of glycolytic intermediates in yeast cells with oscillatory metabolic control, *Arch. Biochem. Biophys.* **109**, 585-594
- Bieberich, E. und Guiseppi-Elie, A. (2004), Neuronal differentiation and synapse formation of PC12 and embryonic stem cells on interdigitated microelectrode arrays: Contact structures for neuron-to-electrode signal transmission (NEST), *Biosens. Bioelectr.* **19**, 923 - 931
- Birbaumer, N. und Schmidt, R.F. (1996), Biologische Psychologie, 3rd ed., Springer Verlag, Berlin
- Birbaumer, N., Strehl, U. und Hinterberger, T. (2004), Brain-computer interfaces for verbal communication. In: Neuroprosthetics: Theory and Practice. Horch, K.W. und Dhillon, G.S. (Ed.), World Scientific, New Jersey, 1146–1157
- Borkholder, D.A. (1998), Cell based biosensors using microelectrodes, PhD Thesis, Department of Electrical Engineering, Stanford University
- Böttcher, W., Merkle, F. und Weitkemper, H.-H. (2003), Historische Entwicklung der künstlichen Stimulation des Herzens, *Z. Herz- Thorax- Gefäßchir.* **17**, 24–34
- Bove, M., Grattarola, M., Martinoia, S. und Verreschi, G. (1995), Interfacing cultured neurons to planar substrate microelectrodes: characterization of the neuron-to-microelectrode junction, *Bioelectrochem. Bioenergetics* **38**, 255–265
- Breckenridge, L.J., Wilson, R.J.A., Connolly, P., Curtis, A.S.G., Dow, J.A.T., Blackshaw, S.E. und Wilkinson, C.D.W. (1995), Advantages of using microfabricated extracellular electrodes for in vitro neuronal recording, *J. Neurosci.* **42**, 266–276
- Briggs, R.J.S., Tykocinski, M., Stidham, K. und Roberson, J.B. (2005), Cochleostomy site: Implications for electrode placement and hearing preservation, *Acta Oto-Laryngologica* **125** (8), 870-876
- Buitenweg, J.R., Rutten, W.L.C., Marani, E., Polman, S.K.L. und Ursum, J. (2002), Extracellular detection of active membrane currents in the neuron-electrode interface, *J. Neurosci. Meth.* **115**, 211-221
- Carvell, J.P. und Turner, K. (2003), New Applications and Methods Utilising Radio-Frequency Impedance Measurements for Improving Yeast Management, *MBAA TQ* **40**, 30-38

-
- Chang, B.-W., Chen, C.-H., Ding, S.-J., Chen, D. C.-H. und Chang, H.-C. (2005), Impedimetric monitoring of cell attachment on interdigitated microelectrodes, *Sens. Act. B* **105**, 159-163
- Chapman, D.L. (1913), A Contribution to the Theory of Electrocapillarity, *Philos. Mag.* **25**, 475-481
- Chowdhuri, S. und Chandra, A. (2001), Molecular dynamics simulations of aqueous NaCl and KCl solutions: Effects of ion concentration on the single-particle, pair, and collective dynamical properties of ions and water molecules, *J. Chem. Phys.* **115**, 3732-3741
- Chua, L.O. (1980), Device modeling via basic nonlinear circuit elements, *IEEE Trans. Circuits Syst.* **27**, 1014-1044
- Cotton, J.B. und Hanson, B.H. (1994), Titanium and Zirconium, in Shreir, L.L., Jarman, R.A. und Burstein, G.T (eds), Corrosion, Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, 37-61
- Danø, S. (1999), Glycolytic Oscillations in Yeast Cells: The nonlinear dynamics of metabolism studied in living yeas cells, Dissertation, University of Copenhagen, Denmark
- de Lima A.D. und Voigt T. (1999), Astroglia inhibit the proliferation of neocortical cells and prevent the generation of small GABAergic neurons in vitro, *Eur. J. Neurosci.* **11**, 3845-3856
- Dellweg, H., Schmid, R.D. und Trommer W.E. [Hrsg.] (1992), Römpp Lexikon Biotechnologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- den Otter, M.W. (2002), Approximate expressions for the capacitance and electrostatic potential of interdigitated electrodes, *Sens. Act. A* **96**, 140-144
- Deng, J., Schoenbach, K.H., Buescher, E.S., Hair, P.S., Fox, P.M. und Beebe, S.J. (2003), The effects of intense submicrosecond electrical pulses on cells, *Biophys. J.* **84**, 2709-2714
- Destexhe, A., Mainen, Z., und Sejnowski, T.J. (1994), An efficient method for computing synaptic conductances based on the kinetic model of receptor binding, *Neural Comp.* **6**, 14-18
- Diwan B.A., Kasprzak K.S. und Rice J.M. (1992). Transplacental carcinogenic effects of nickel(II) in the renal cortex, renal pelvis and adenohypophysis in F344/NCr rats, *Carcinogenesis* **13**, 1351-1357
- Dugdale, I. und Cotton, J.B. (1964), The anodic polarization of titanium in halide solutions, *Corros. Sci.* **4**, 397-411
-

- Engan H. (1969), Excitation of elastic surface waves by spatial harmonics of interdigital transducers, *IEEE Trans.* **16**, 1014-1017
- Egert, U., Schlosshauer, B., Fennrich, S., Nisch, W., Fejtl, M., Knott, T., Müller, T. und Hammerle, H. (1998), A novel organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated multielectrode arrays, *Brain Res. Protoc.* **2**, 229–242
- Egert, U., Heck, D. und Aertsen, A. (2002), Two-dimensional monitoring of spiking networks in acute brain slices, *Exp. Brain. Res.* **142**, 268–274
- Ekeström S., Johansson L. und Lagergren, H. (1962), Behandling av Adam Stokes syndrom med intracardiell pacemaker-electrod, *Opuscula Medica* **7**, 175–176
- Eytan, D., Brenner, N. und Marom, S. (2003), Selective Adaptation in Networks of Cortical Neurons, *J. Neurosci.* **23** (28), 9349-9356
- Formeln und Tabellen für die Sekundarstufen I und II, 5. überarb. Auflage, Paetec, Berlin
- Fromherz, P. (2003), Neuroelectronic Interfacing: Semiconductor Chips with Ion Channels, Nerve Cells and Brain in *Nanoelectronics and Information Technology*, Wiley-VCH, Berlin, 781-810
- Galvani, A.L. (1791), De viribus electricitatis in motu musculari commentarius, *Bonon. Sci. Art. Inst. Acad. Comment.* **7**, 363-418.
- Geddes, L.A. und Roeder, R. (2001), Measurements of the direct-current (faradic) resistance of the electrode-electrolyte interface for commonly used electrode materials, *Ann. Biomed. Eng.* **29**, 181-186
- Geddes, L.A. und Roeder, R. (2003), Criteria for the selections of materials for implanted electrodes, *Ann. Biomed. Eng.* **31**, 879-890
- Gerstner, W. und Kistler, W. (2002), Spiking Neuron Models. Single Neurons, Populations, Plasticity, Cambridge University Press, Cambridge – New York – Port Melbourne – Madrid – Cape Town, 31-67
- Gimsa, J. und Wachner, D. (1998), A Unified Resistor-Capacitor Model for Impedance, Dielectrophoresis, Electrorotation, and Induced Transmembrane Potential, *Biophys. J.* **75**, 1107-1116
- González, A., Ramos, A., Green, N.G., Castellanos, A. und Morgan H. (2000), Fluid flow induced by nonuniform ac electric fields in electrolytes on microelectrodes. II. A linear double-layer analysis, *Phys. Rev. E* **61**, 4019-4028
- Gouy, G. (1910), Constitution of the Electric Charge at the Surface of an Electrolyte, *J. Phys.* **9**, 457-467

- Grahame, D.C., (1947), The electrical double layer and the theory of electrolcapillarity, *Chem. Rev.* **41**, 441-501
- Green, N., Ramos, A., Gonzáles, A., Morgan, H. und Castellanos, A. (2000), Fluid flow induced by nonuniform ac electric fields in electrolytes on microelectrodes. I. Experimental measurements, *Phys. Rev. E* **61**, 4011-4018
- Green, N., Ramos, A., Gonzáles, A., Morgan, H. und Castellanos, A. (2002), Fluid flow induced by nonuniform ac electric fields in electrolytes on microelectrodes. III. Observation of streamlines and numerical simulation, *Phys. Rev. E* **66**, 026305
- Green T, (1872), On death from chloroform: its prevention by galvanism, *Brit. Med. J.* **1**, 551-553
- Guilbault, G.G. (1990), Practical Fluorescence, Marcel Dekker, New York
- Guillou, S. und El Murr, N. (2002), Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in solution by low-amperage electric treatment, *J. Appl. Microbiol.* **92**, 860-865
- Günther, S. (2004), Stimulation- und Ableitprozesse in Metallelektroden- Neuronen- Interfaces, Diplomarbeit, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
- Günther, S. (2003), Elektrische Charakterisierung von Metall-Glas-Elektrodenarrays, Forschungsbeleg, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg
- Habel, Beate (2004), Elektrische Stimulation von Zellen und Gewebe am besonderen Beispiel von Knochenzellen, Dissertation, Humboldt-Universität Berlin
- Hamann, C. und Vielstich, W. (1998), Elektrochemie, Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- Hannoversche Cochlear-Implant-Gesellschaft e.V. (2000), HNO-Klinik der Medizinischen Hochschule Hannover, Hannover
- Harkins, A.B., Kurebayashi, N. und Baylor, S.M. (1993), Resting myoplasmic free calcium in frog skeletal muscle fibers estimated with fluo-3, *Biophys J.* **65**, 865-881
- Harnack, D., Winter, C., Meissner, W., Reum, T., Kupsch, A. und Morgenstern, R. (2004), The effects of electrode material, charge density and stimulation duration on the safety of high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus in rats, *J. Neurosci. Meth.* **138** (1-2), 207-216 (noch nicht im text)
- Harvey, A.R. (1980), A physiological analysis of subcortical and commissural projections of areas 17 and 18 of the cat, *J. Physiol.* **302**, 507-534
- Hess, B., Boiteux, A. und Krüger, J. (1969), Cooperation of glycolytic enzymes, *Adv. Enzyme Regul.* **7**, 149-167

- Heuschkel, M.O., Fejtl, M., Raggenbass, M., Bertrand, D. und Renaud, P. (2002), A three-dimensional multi-electrode array for multi-site stimulation and recording in acute brain slices, *J. Neurosci. Meth.* **114** (2), 135-148.
- Hewlett Packard (1993), Bedienungsanleitung 150-MHz-Pulsgenerator HP8110A, Deutschland
- Huettner, J.E und Baughman, R.W. (1988), The pharmacology of synapses formed by identified corticocollicular neurons in primary cultures of rat visual cortex, *J. Neurosci.* **8**, 160-175
- Hille, B. (2001), Ion channels of excitable membranes, 3rd ed., Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc.
- Holzapfel, C., Vienken, J., Zimmermann, U. (1982), Rotation of Cells in an Alternating Electric Field: Theory and Experimental Proof, *J. Membrane Biol.* **67**, 13-26
- Hong, S., Ergezen, E., Lec, R. und Barbee, K.A. (2006), Real-time analysis of cell-surface adhesive interactions using thickness shear mode resonator, *Biomater.* **27**, 5813-5820
- HP4284A, Handbuch Präzisions-LCR-Meter HP4284A, Hewlett-Packard Company, Palo Alto, USA
- Hubalek, J. und Krejci, J. (2003), Correction factors of IDEs for precise conductivity measurements, *Sens. Act. B* **91**, 46-51
- Jacob, H.E., Förster, W., und Berg, H. (1981), Microbiological implications of electric field effects. II. Inactivation of yeast cells and repair of their cell envelope, *Z. Allg. Mikrobiologie* **21**, 225-232
- Jahnsen, H., Kristensen, B.W., Thiébaud, P., Noraberg, J., Jakobsen, B., Bove, M., Martinoia, S., Koudelka-Hep, S., Grattarola, M. und Zimmer, J. (1999), Coupling of Organotypic Brain Slice Cultures to Silicon-Based Arrays of Electrodes, *Meth. Enzymol.* **18**, 160-172
- Javidan, M., Elek, J. und Prochazka, A. (1992), Attenuation of pathological tremors by functional electrical stimulation II: Clinical evaluation, *Ann. Biomed. Eng* **20** (2), 225-236
- Jimbo, Y. und Kawana, A. (1992), Electrical stimulation and recording from cultured neurons using a planar electrode array, *Bioelectrochem. Bioenergetics* **29**, 193-204
- Jimbo, Y., Robinson, H.P.C. und Kawana, A. (1993), Simultaneous measurement of intracellular calcium and electrical activity from patterned neural networks in culture, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **40**(8), 804-810

- Jogl, C. (2005), Quasi-in-situ Photoelektronen-Spektroskopie an elektrochemisch hergestellten Filmen, Dissertation, Technische Universität Wien
- Kaatze, U. (1989), Complex Permittivity of Water as a Function of Frequency and Temperature, *J. Chem. Eng. Data* **37**, 371-374
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H. und Jessell, T.M. (2000), Principles of neural science, McGraw-Hill Company, New York – St. Louis – San Francisco – Auckland – Bogotá – Caracas – Lisbon – London – Madrid – Mexico City – Milan – Montreal – New Delhi – San Juan – Singapore – Sydney – Tokyo – Toronto
- Karlson, P., Doenecke, D. und Koolman, J. (1994), Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, Georg Thieme Verlag, Stuttgart – New York
- Kartalopoulos, S.V. (1995), Understanding Neural Networks and Fuzzy Logic: Basic Concepts and Applications, Wiley-IEEE Press
- Katchalsky, A., Danon, D., Nevo, A. und de Vries, A. (1959), Interactions of basic polyelectrolytes with the red blood cell, II. Agglutination of red blood cells by polymeric bases, *Biochim. Biophys. Acta* **33**, 120-138
- Kock, M. (2004), Grenzen und Möglichkeiten der elektrochemischen Mikrostrukturierung mit ultrakurzen Spannungspulsen, Dissertation, Freie Universität Berlin
- Koolman, J. und Röhm, K.-H. (1998), Taschenatlas der Biochemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York
- Kovacs, G.T.A. (1994), Introduction to the theory, design, and modeling of thin-film micro-electrodes for neural interfaces, *Enabling Technologies for Cultured Neural Networks*, Stenger, D.A. und McKenna, T. (Ed.), Academic, London, 121–65
- Kuncel, A.W. Und Grill, W.M. (2004), Selection of stimulus parameters for deep brain stimulation, *Clin. Neurophysiol.* **115**, 2431-2441
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. und Cox, M.M. (1995), Prinzipien der Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg – Berlin – Oxford
- Lenarz, T., Lesinski-Schiedat, A., Weber, B.P., Issing, P.R., Frohne, C., Büchner, A., Battmer, R.-D., Parker, J. und Wallenberg, E.V. (2001), The nucleus double array Cochlear implant: A new concept for the obliterated cochlea, *Otology and Neurotology* **22** (1), 24-32
- Li, H. und Bashir, R. (2002), Dielectrophoretic separation and manipulation of live and heat-treated cells of *Listeria* on microfabricated devices with interdigitated electrodes, *Sens. Act. B* **86**, 215-221

- Li, W.H., Du, H., Chen, D.F. und Shu, C. (2004), Analysis of dielectrophoretic electrode arrays for nanoparticle manipulation, *Comp. Mat. Sci.* **30**, 320-325
- Liang, J. (2004), The Influence of Morphine and GR89696 on NMDA receptor Phosphorylation, *J. Undergrad. Res.* **5** (5)
- Life Technologie, Life Technologies Katalog 2001
- Lipkowski, J. und Ross, P.N. (Hrsg.), (1993), Structure of Electrified Interfaces, VCH Publications, New York
- Lüders, H.O. (2004), Deep Brain Stimulation and Epilepsy, Dunitz, London
- Maeda, E., Robinson, H.P.C. und Kawana, A. (1995), The mechanisms of generation and propagation of synchronized bursting in developing networks of cortical neurons, *J. Neurosci.* **15** (10), 6834-6845
- Mair, T., Warnke, C., Tsuji, K. und Müller, S.C. (2005), Control of Glycolytic Oscillations by Temperature, *Biophys. J.* **88**, 639-646
- Martinoia, S., Massobrio, P., Bove, M. und Massobrio, G. (2004), Cultured Neurons Coupled to Microelectrode Arrays: Circuit Models, Simulations and Experimental Data, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **51**, 859-864
- Martinoia, S. und Massobrio, P. (2004), ISFET–neuron junction: circuit models and extracellular signal simulations, *Biosens. Bioelectr.* **19**, 1487–1496
- Martinsen, O.G., Grimnes, S. und Schwan, H.P. (2002), Interface phenomena and dielectric properties of biological tissue, *Encyclopedia of Surface and Colloid Science* 2643-2652
- Massobrio, G. und Antognetti, P. (1993), Semiconductor Device Modeling with SPICE, 2nd ed. McGraw-Hill, New York
- Mauro, A. (1961), Anomalous impedance, a phenomenological property of time-variant resistance, *Biophysical J.* **1**, 353–372
- McCreery, D.B., Agnew, W.F., Yuen, T.G.H. und Bullara, L.A. (1990), Neuronal and axonal injury during functional electrical stimulation; A review of the possible mechanisms, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **37**, 996-1001
- McCreery, D., Lossinsky, A., Pikov, V. und Liu, X. (2006), Microelectrode Array for Chronic Deep-Brain Microstimulation and Recording, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **53** (4), 726-737
- McIntyre, C.C. und Grill, W.M (1999), Excitation of Central Nervous System Neurons by Nonuniform Electric Fields, *Biophys. J.* **76**, 878-888

-
- McIntyre, C.C. und Grill, W.M (2001), Finite Element Analysis of the Current-Density and Electric Field Generated by Metal Microelectrodes, *Ann. Biomed. Eng.* **29**, 227-235
- meetB, Gesellschaft für Medizintechnik mbh, Potsdam, Germany
- Mochan, E. und Pye, E.K. (1973), Respiratory Oscillations in Adapting Yeast Culture, *Nature New Biology* **254**, 177-179
- Molecular Probes (2002), Fluorescence Microplate Assays, 7th edition, Molecular Probes, Inc.
- Morgan, D.P. (1985), Surface-Wave Devices for Signal Processing, Elsevier, Amsterdam
- Multi Channel Systems, MCS GmbH, Reutlingen, Germany
- Navarro, X., Krueger, T.B., Lago, N., Micera, S., Stieglitz, T. und Dario, P. (2005), A critical review of interfaces with the peripheral nervous system for the control of neuroprostheses and hybrid bionic systems, *J. Peripheral Nervous System* **10**, 229-258
- NeuroNexus Technologies, Ann Arbor, USA (MI)
- Newman, J. (1966), Resistance for flow of current to a disk, *J. Electrochem. Soc.* **113**, 501–502
- Nevo, A., de Vries, A. und Katchalsky A. (1955), Interactions of basic polyamino acids with the red blood cell, I. Combination of Polylysine with single cells, *Biochim. Biophys. Acta* **17**, 536-547
- Nörenberg, A. (2006), Wirkung elektrischer Stimulation auf die Netzwerkentwicklung neokortikaler Zellkulturen, Diplomarbeit, Universität Magdeburg
- North, R.B., Kidd, D.H., Olin, J., Sieracki, J.M., Farrokhi, F., Petrucci, L. und Cutchis, P.N. (2005), Spinal cord stimulation for axial low back pain: A prospective, controlled trial comparing dual with single percutaneous electrodes, *Spine* **30** (12), 1412-1418
- Novak, J.L. und Wheeler, B.C. (1988), Multisite hippocampal slice recording and stimulation using a 32 element microelectrode array, *J. Neurosci. Meth.* **23** (2), 149-159
- Nowak, L.G. und Bullier, J. (1998a), Axons, but not cell bodies, are activated by electrical stimulation in cortical gray matter, I. Evidence from chronaxie measurements, *Exp. Brain Res.* **118**, 477-488
- Nowak, L.G. und Bullier, J. (1998b), Axons, but not cell bodies, are activated by electrical stimulation in cortical gray matter, II. Evidence from selective inactivation of cell bodies and axon initial segments, *Exp. Brain Res.* **118**, 489-500
- Obeso, J.A., Guridi, J. und DeLong, M. (1997), Surgery for Parkinson's disease, *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* **62** (1), 2-8
-

- Opitz, T, de Lima, A.D. Und Voigt, T. (2002), Spontaneous development of synchronous oscillatory activity during maturation of cortical networks in vitro, *J. Neurophysiol.* **88**, 2196–2206,
- Opitz, T. (2003), persönliche Mitteilung
- Paik, S.-J., Park, Y. und Cho, D.D. (2003), Roughened polysilicon for low impedance microelectrodes in neural probes, *J. Micromech. Microeng.* **13**, 373–379
- Parak, W.J. (1999), Zell-Halbleiter-Hybride, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Pauly, H. und Schwan H.P. (1959), Über die Impedanz einer Suspension von kugelförmigen Teilchen mit einer Schale, *Z. Naturforsch.* **14B**, 125-131
- Peters, A., S. L. Palay und H. F. Webster (1991), The Fine Structure of the Nervous System, Oxford University Press, Oxford
- Perez, Y., Chapman, C.A., Woodhall, G., Robitaille, R. und Lacaille, J.-C. (1999), Differential induction of long-lasting potentiation of inhibitory postsynaptic potentials by theta patterned stimulation versus 100-Hz tetanization in hippocampal pyramidal cells *in vitro*, *Neurosci.* **90**(3), 747–757
- Pething, R. (1987), Dielectric properties of body tissues, *Clin. Phys. Physiol. Meas.* **8**, 5-12
- Pethig, R., Huang, Y., Wang, X.-B. und Burt, J.P.H. (1992), Positive and negative dielectrophoretic collection of colloidal particles using interdigitated castellated microelectrodes, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **24**, 881-888
- Pohl, H.A. Und Crane, J.S. (1971), Dielectrophoresis of cells, *Biophys. J.* **11**, 717-727
- Pohl, H.A., Pollock, K. und Crane, J.S. (1978), Dielectrophoretic force: A comparison of theory and experiment, *J. Biol. Phys.* **6**, 133-160
- Prasad, S., Zhang, X., Yahn, M., Ni, Y., Parpura, V., Ozkan, C. und Ozkan, M. (2004), Separation of individual neurons using dielectrophoretic alternative current fields, *J. Neurosci. Meth.* **135**, 79-88
- Pressemitteilung Retina Implant GmbH, März 2007
- Pye, K. und Chance, B. (1966), Sustained Sinusoidal Oscillations of Reduced Pyridine Nucleotide in a Cell-Free Extract of *Saccharomyces Carlsbergensis*, *Biochem.* **55**, 888-894
- Pye, E.K. (1968), Biochemical mechanisms underlying the metabolic oscillations in yeast. *Canadian Journal of Botany* **47**, 271-285

- Ramos, A., Morgan, H. Green, N.G. und Castellanos, A. (1998), Ac electrokinetics: a review of forces in microelectrode structures, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **31**, 2338-2353
- Ramos, A., Morgan, H. Green, N.G. und Castellanos, A. (1999a), AC Electric-Field-Induced Fluid Flow in Microelectrodes, *J. Colloid Interface Sci.* **217**, 420-422
- Ramos, A., Morgan, H. Green, N.G. und Castellanos, A. (1999b), The role of electrohydrodynamic forces in the dielectrophoretic manipulation and separation of particles, *J. Electrostat.* **47**, 71-81
- Ranck, J.B. (1975), Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system: a review, *Brain Res.* **98**, 417-440
- Rattay, F. (1999), The basic mechanism for the electrical stimulation of the nervous system, *Neurosci.* **89**, 335-346
- Regehr, W.G., Pine, J. und Rutledge, D.B. (1988), A long-term in vitro silicon-based microelectrode - Neuron connection, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **35** (12), 1023-1032
- Regehr, W.G., Pine, J., Cohan, C.S., Mischke, M.D. und Tank, D.W. (1989), Sealing cultured invertebrate neurons to embedded dish electrodes facilitates long-term electrical stimulation and recording, *J. Neurosci. Meth.* **30**, 91-106
- Reijenga, K.A., Snoep, J.L., Diderich, J.A., van Verseveld, H.W., Westerhoff, H.V. und Teusink, B. (2001), Control of Glycolytic Dynamics by Hexose Transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biophys. J.* **80**, 626-634
- Reinert, T (2004), In vitro Charakterisierung von peripheren bushy cells im AVCN der mongolischen Wüstenrennmaus, Diplomarbeit, Universität Leipzig
- Richard, P., Teusink, B., Westerhoff, H.V. und van Dam, K. (1993), Around the growth phase transition *S.cerevisiae*'s make up favours sustained oscillations of intracellular metabolites. *FEBS Letters* **318**, 1, 80-82
- Richard, P., Bakker, B.M., Teusink, B., Van Dam, K. und Westerhoff, H.V. (1996), Acetaldehyde mediates the synchronization of sustained glycolytic oscillations in populations of yeast cells, *Eur. J. Biochem.* **235**, 238-241
- Robblee, L.S., McHardy, J., Agnew, W.F. und Bullara, L.A. (1983), Electrical stimulation with Pt electrodes. VII. Dissolution of Pt electrodes during electrical stimulation of the cat cerebral cortex, *J. Neurosci. Meth.* **9** (4), 301-308
- Robinson, D.A. (1968), The electrical properties of metal microelectrodes, *Proc. IEEE* **56**, 1065-1071
- Rousche, P.J. und Normann, R.A. (1998), Chronic recording capability of the Utah intracortical electrode array in cat sensory cortex, *J. Neurosci. Meth.* **82** (1), 1-15

- Rubin, C.T., Donahue, H.J., Rubin, J.E. und McLeod K.J. (1993), Optimization of electric field parameters for the control of bone remodeling: exploitation of an indigenous mechanism for the prevention of osteopenia, *J. Bone Miner. Res.* **8**, 573-S581
- Rubinstein, I. (1995), Physical Electrochemistry, Marcel Dekker, Inc., New York – Basel – Hong Kong
- Rutten, W., Mouveroux, J.-M., Buitenweg, J., Heida, C., Ruardij, T., Marani, E. und Lakke, E. (2001), Neuroelectronic Interfacing with Cultured Multielectrode Arrays toward a Cultured Probe, *Proc. IEEE* **89**, 1013-1029
- Sachse, H. (1995), Tandem-Photolithographie-Verfahren, VDI Verlag, Düsseldorf
- Schlegel, H.G. (1992), Allgemeine Mikrobiologie, Stuttgart
- Schmickler, W. und Henderson, D. (1996), New Models for the Electrochemical Interface, *Prog. Surf. Sci.* **22**, 332-419
- Schoen, I. und Fromherz, P. (2005), Activation of Na⁺ channels in cell membrane by capacitive stimulation with silicon chip, *Appl. Phys. Lett.* **87**, 193901
- Schrive, L., Grasmick, A., Moussière, S., and Sarrade, S. (2006), Pulsed electric field treatment of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions: A mechanistic approach coupling energy transfer, mass transfer and hydrodynamics *Biochem. Eng. J.* **27**, 212-224
- Schwarz, G. (1962), A theory of the low-frequency dielectric dispersion of colloidal particles in electrolyte solution, *J. Phys. Chem.* **66**, 2636-2642
- Starovoytov, A., Choi, J. und Seung, H.S. (2005), Light-Directed Electrical Stimulation of Neurons Cultured on Silicon Wafers, *J. Neurophysiol* **93**, 1090–1098
- Steidl, E.-M., Neveu, E., Bertrand, D. und Buisson, B. (2006), The adult rat hippocampal slice revisited with multi-electrode arrays, *Brain Research* **1096** (1), 70-84
- Steinhoff, G., Baur, B., Wrobel, G., Ingebrandt, S., Offenhäusser, A., Dadgar, A., Krost, A., Stutzmann, M. und Eickhoff, M. (2005), Recording of cell action potentials with AlGaNGaN field-effect transistors, *Appl. Phys. Lett.* **86** (3), 033901
- Stieglitz, T. und Meyer, J.-U. (1998), Microtechnical interfaces to neurons, in Manz, A., Becker, H. (eds.), *Microsystem Technology in Chemistry and Life Science (Topics in Current Chemistry Series)*, Springer, Berlin – Heidelberg, Vol. **194**, 131-162
- Storace, M., Bove, M., Grattarola, M. und Parodi, M. (1997), Simulations of the behavior of synaptically driven neurons via time-invariant circuit models, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **44**, 1282–1287

- Suehiro, J., Hatano, T., Shutou, M. und Hara, M. (2005), Improvement of electric pulse shape for electroporation-assisted dielectrophoretic impedance measurement for high sensitive bacteria detection, *Sens. Actuat. B* **109**, 209-215
- Taylor, C.P. und Dudek, F.E. (1984), Synchronization without active chemical synapses during hippocampal afterdischarges, *J. Neurophysiol.* **52** (1), 126-142
- Teissie, J., Knox, B.E., Tsong, T.Y., und Wehrle, A. (1981), Synthesis of adenosinetriphosphate in respiration-inhibited submitochondrial particles induced by microsecond electric pulses, *Biochem.* **78**, 7473-7477
- Thiele, A., Delicato, L.S., Roberts, M.J. und Gieselmann, M.A. (2006), A novel electrode-pipette design for simultaneous recording of extracellular spikes and iontophoretic drug application in awake behaving monkeys, *J. Neurosci. Meth.* **158** (2), 207-211
- Tomov, T.C. und Tsoneva, I.C. (1988), Electroinduction of long-lived membrane potentials in yeasts, *J. Electroanal. Chem.* **253**, 397-403
- Vassanelli S. und Fromherz, P. (1999), Transistor Probes Local Potassium Conductances in the Adhesion Region of Cultured Rat Hippocampal Neurons, *J. Neurosci.* **19**, 6767-6773
- Voigt, T., Opitz, T. und de Lima, A.D. (2005), Activation of Early Silent Synapses by Spontaneous Synchronous Network Activity Limits the Range of Neocortical Connections, *J. Neurosci.* **25** (18), 4605-4615
- Wagenaar, D.A., Pine, J. und Potter, S.M. (2004), Effective parameters for stimulation of dissociated cultures using multi-electrode arrays, *J. Neurosci. Meth.* **138**, 27-37
- Warnke, C. (2003), Externe Kontrolle räumlich-zeitlicher Muster des Energiestoffwechsels von Bierhefe mittels Temperaturgradienten, Diplomarbeit, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
- Winfrey, A.T. (1972), Oscillatory glycolysis in yeast: The pattern of phase resetting by oxygen, *Arch. Biochem. Biophys.* **149**, 388-401
- Wrobel, G., Zhang, Y., Krause, H.-J., Wolters, N., Sommerhage, F., Offenhäusser, A. und Ingebrandt, S. (2007), Influence of the first amplifier stage in MEA systems on extracellular signal shapes, *Biosens. Bioelectr.* **22** (6), 1092-1096
- Yamamoto, J., Ikeda, A., Kinoshita, M., Matsumoto, R., Satow, T., Takeshita, K., Matsushashi, M., Mikuni, N., Miyamoto, S., Hashimoto, N. und Shibasaki, H. (2006), Low-frequency electric cortical stimulation decreases interictal and ictal activity in human epilepsy, *Seizure* **15** (7), 520-527

- Yates, D.E., Levine, S. und Healy, T.W. (1974), Site-binding model of the electrical double layer at the oxide/water interface, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **70**, 1807–1818
- Yeh, S.-R., Seul, M. und Shraiman, B.I. (1997), Assembly of ordered colloidal aggregates by electric-field-induced fluid flow, *Nature* **386**, 57-59
- Yelnik, J., Damier, P., Bejjani, B.P., Francois, C., Gervais, D., Dormont, D., Arnulf, I., Bonnet, A.M., Cornu, P., Pidoux, B. UndAgid, Y. (2000), Functional mapping of the human globus pallidus: contrasting effect of stimulation in the internal and external pallidum in Parkinson's disease, *Neurosci.* **101** (1), 77-87
- Zhu, H., Ji, J. und Shen, J. (2004), Construction of multilayer coating onto poly-(DL-lactide) to promote cytocompatibility, *Biomater.* **25**, 109-117

8. Anhang

8.1. Ätzen der Oberfläche der Deckgläschen

Tab. 8.1: Oberflächenbehandlung der Deckgläschen

Vorgang	Chemische Substanz	Zeitdauer
Lagern	2N-NaOH	1 h
3 x Spülen	Dest. Wasser	
Lagern	70% HNO ₃	3 d
3 x Spülen	Dest. Wasser	
Lagern	9N-HCl	1 h
10 x Spülen	Dest. Wasser	
Lagern	100% Ethanol	1/2 h
1 x Spülen	Dest. Wasser	
Lagern	80% Ethanol	Bis zur Verwendung
Trocken		2 h

8.2. Zusammensetzung der Kulturmedien der Neuronen

Hank's, steril filtriert und ohne Calcium und Magnesium

Die Stammlösung (Invitrogen, Karlsruhe) war 10fach konzentriert. Nach einer 1:10 Verdünnung wurde noch eine HEPES-Lösung (1 M) zugesetzt, die durch Lösen von 4.76 g HEPES in 20 ml destilliertem Wasser entstand. Die HEPES-Lösung wurde vor ihrer Zugabe zur Stammlösung mit 1 N NaOH auf einen pH-Wert von 7.4 eingestellt.

Dulbecco's Modification Eagle Medium (DMEM; Invitrogen, Karlsruhe), steril filtriert

Um den pH auf 7.4 einzustellen, wurde Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) dazugegeben und gegebenenfalls mit 1 N HCl oder 1 N NaOH korrigiert. Für die Herstellung serumhaltigen DMEMs wurden 10% fetales Kälberserum (Pan Systems, Aidenbach) dazugegeben.

Ham's F12 (Invitrogen, Karlsruhe), steril filtriert

Der pH wurde mit NaHCO_3 eingestellt und gegebenenfalls mit 1 N HCl korrigiert.

N2- (Bottenstein and Sato, 1979), steril filtriert

Dieses Medium bestand aus folgenden Substanzen:

75% DMEM, 25% Ham's F12 und Supplement N2 (Invitrogen, Karlsruhe), das aus 10 $\mu\text{g/ml}$ Insulin, 10.7 ng/ml Natriumselenit, 32 $\mu\text{g/ml}$ Putrescin und 14 ng/ml Progesteron bestand. Dieser erworbenen Substanz wurden noch 20 ng/ml Triiodo-L-Thyronin und 0.2 $\mu\text{g/ml}$ Corticosteron (beide Sigma, Taufkirchen) hinzugefügt.

Hank's-Trypsin-EDTA-Gemisch (Invitrogen, Karlsruhe)

Die 10fach konzentrierte Lösung wurde 1:10 in Hank's verdünnt und verwendet.

Trypsin Inhibitor/DNase Lösung, steril filtriert

Hierfür wurden 0,52 mg/ml Trypsin Inhibitor (aus der Sojabohne; Sigma, Taufkirchen), 0.04 mg/ml DNase I (Sigma) und 3 mg/ml bovines Serumalbumin (Invitrogen, Karlsruhe) in DMEM gelöst.

Tab. 8.2: Stoffkonzentrationen von aCSF

Inhaltsstoff	Konzentration
NaCl	8.182 (≈ 0.14 M)
KCl	0.373
$\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$	0.221
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0.172
Glukose $\times \text{H}_2\text{O}$	3.963 (≈ 20 mM)

Tab. 8.3: Stoffkonzentrationen von DMEM [Life Technologies, 2001]

Inhaltsstoff	Konzentration
NaCl	6400 ($\equiv 0.1$ M)
KCl	400
CaCl ₂	200
Fe(NO ₃)	0.1
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	125
MgSO ₄	97.67
D-Glukose	4500 ($\equiv 25$ mM)
Phenolrot	15
L-Arginin x HCl	84
L-Cystin x 2HCl	62.75
L-Glutamin	584
Glycin	30
L-Histidin HCl x H ₂ O	42
L-Isoleucin	105
L-Leucin	105
L-Lysin x HCl	146
L-Methionin	30
L-Phenylalanin	66
L-Serin	42
L-Threonin	95
L-Tryptophan	16
L-Tyrosin (Di-Natrium-Salz)	104.20
L-Valin	94
D-Ca-Pantothenat	4
Cholinchlorid	4
Folsäure	4
I-Inositol	7.2
Nikotinamid	4
Pyridoxine HCl	4
Riboflavin	4
Thiamin x HCl	4

8.3. Zusammensetzung der Nährmedien für die Hefekulturen

Tab. 8.4: Stammlösungen des Nährmediums

Salze A (50fach konzentriert)		Menge je 200 ml
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	9.375%	18.75 g
H_2PO_4	2.75 %	5.5 g
KCl	2.125 %	4.25 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0.625 %	1.25 g
Salz B (200fach konzentriert)		Menge je 50 ml
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	2.5%	0.85 g
Spurenelemente (1000fach konzentriert)		Menge je 50 ml
$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0.25%	125 mg
MnSO_4	0.25%	125 mg
Vitamine (1000fach konzentriert)		Menge je 100 ml
Pyridoxine/HCl		25 mg
Thiamine		25 mg
Biotin		2.5 mg
Ca-Pantothenate		350 mg
myo-Inositol		1000 mg
	Steril filtern	
Zitronensäure (20fach konzentriert)		Menge je 500 ml
Monohydrat (pH 5 mit festen KOH-Pellets)	0.3M	31.52 g
Casein-Hydrolysat (25fach konzentriert)		Menge je 375 ml
	10%	37.5 g
Glukose (25fach konzentriert)		Menge je 400 ml
	50%	200 g
	20 min autoklavieren	
Tryptophan (5.5fach konzentriert)		1.638 g in 2N KOH lösen

8.3. Zusammensetzung der Nährmedien für die Hefekulturen

Tab. 8.5: Herstellung des Nährmediums und Hefeaufzucht

Substanzen und Arbeitsschritte	Menge für 9.1 l
Hefeextrakt	9.1 g
Salze A	182 ml
Spurenelemente	9.1 ml
Citronensäure	455 ml
Casein-Hydrolyst	364 ml
Salz B	45.5 ml
Tryptophan in KOH	1.638 g
mit destilliertem Wasser auffüllen auf	4500 ml
ph 5.5 mit festem KOH Pellets	
Überführung in Fermenter und auffüllen auf	8727 ml
Durchmischen	
Entnahme der Vorkultur in Schüttelkolben	95.4 ml
Sterilisation der Vorkultur	15 min, 120 °C; 1.2 bar
Zugabe von Antischaummittel zur Hauptkultur	1 ml
Sterilisation der Hauptkultur	60 min, 120 °C; 1.2 bar
<i>STERIL</i> zur Vorkultur geben:	
Glukose	4 ml
Vitamine	0.1 ml
Animpfen der Vorkultur mit einer Impfhefe	
Wachsen der Vorkultur	28 °C, 170 U/min
nach ca. 18 Stunden Zellzahlzählung	
<i>STERIL</i> zur Hauptkultur geben:	
Glukose	360 ml
Vitamine	9 ml
Animpfen der Hauptkultur mit 2.5×10^5 Zellen/ml	
Wachsen der Hauptkultur	28 °C, 550 U/min, 600 l/h
nach ca. 16 Stunden Glukosetest Glukose < 0,1 mM □ Ernte	

8.4. Ergänzungen zur elektrischen Charakterisierung

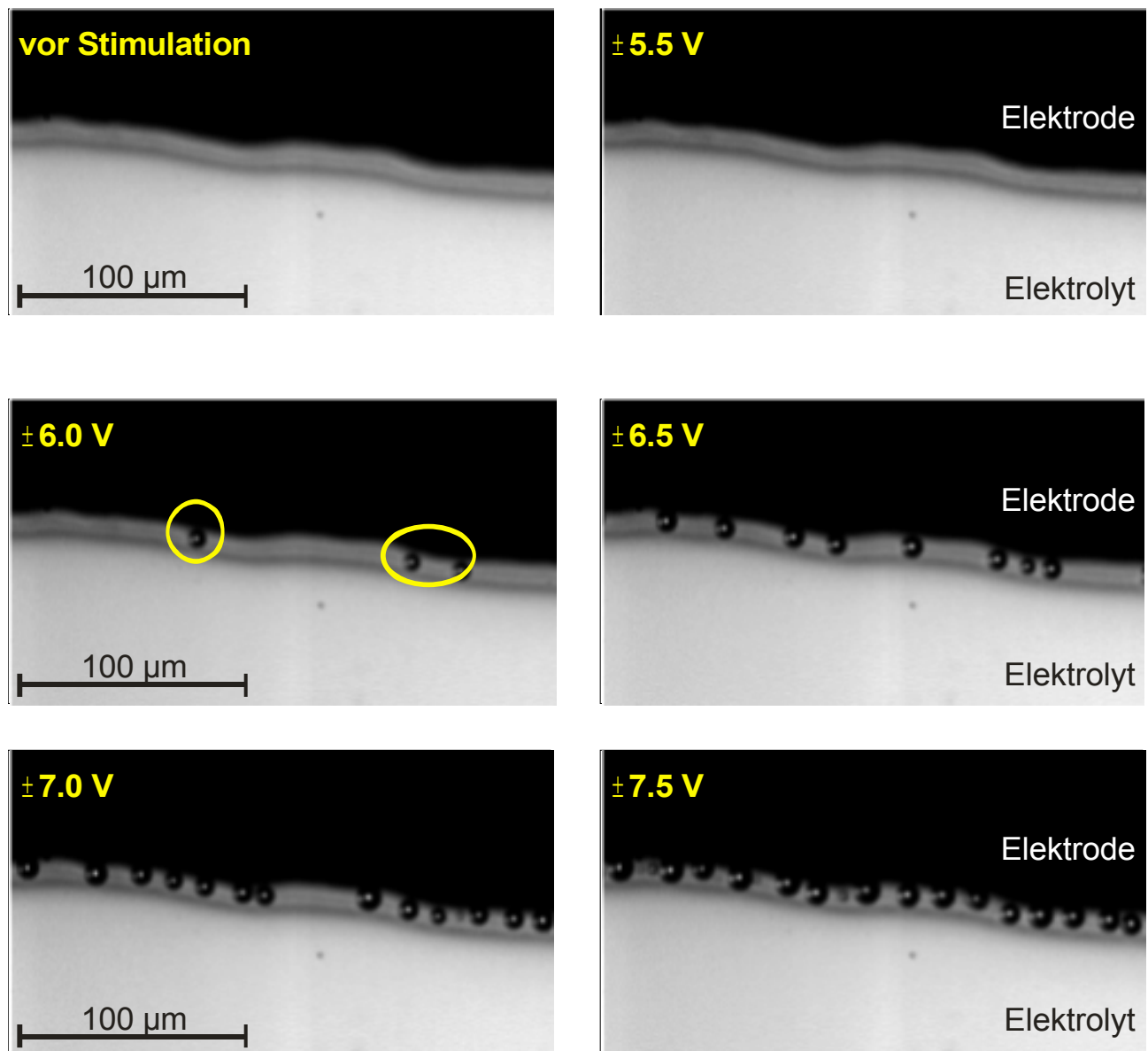


Abb. 8.1: Auftreten von Elektrolyseeffekten in aCSF mit steigender Pulsamplitude des biphasigen Doppelpulses

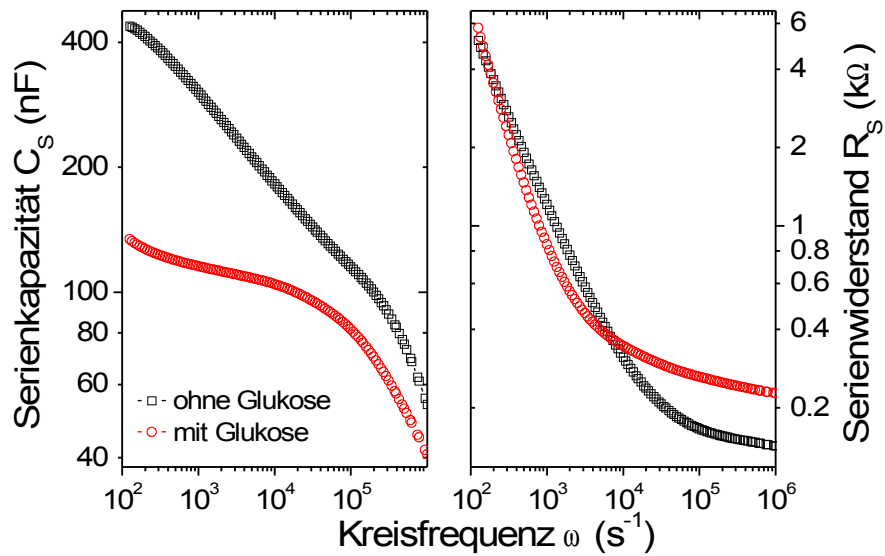


Abb. 8.2: Einfluss der Glukose auf die Impedanzmessungen von 0.1 M KH_2PO_4 (pH-Wert 6.5)

8.5. Einfluss der Flankensteilheit auf die Anzahl angeregter Neuronen

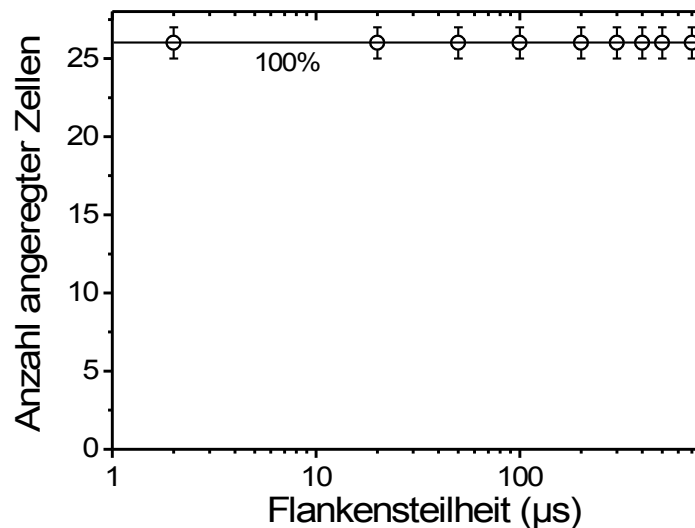


Abb. 8.3: Abhängigkeit der angeregten Zellen von der Flankensteilheit ($U=\pm 2.2$ V, $t_{PB}=1$ ms) einer Neuronenkultur (13 DIV)

8.6. Dauerstimulationsexperimente

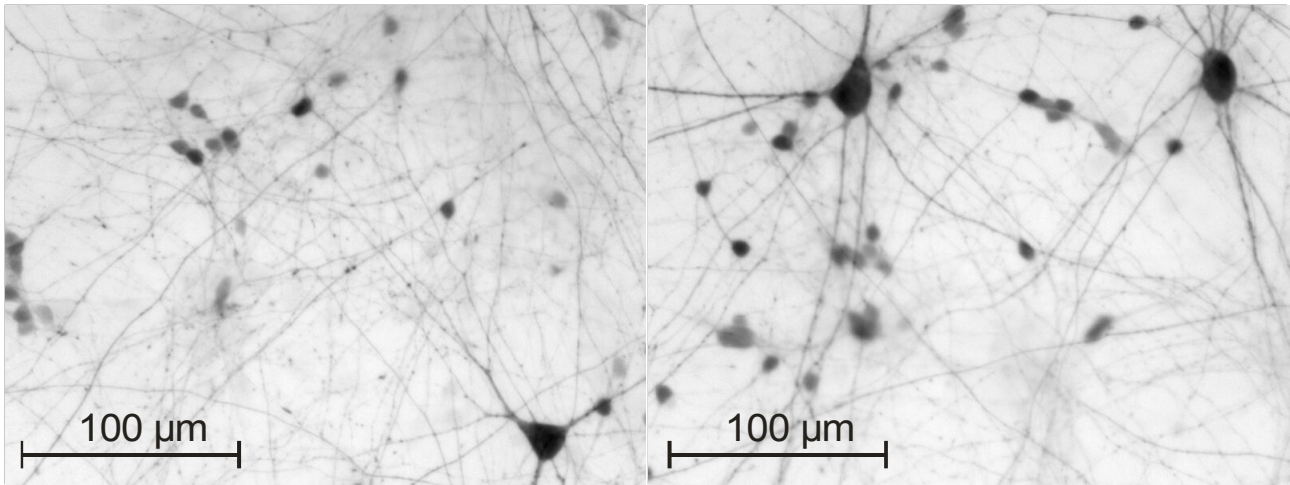


Abb. 8.4: Vergleich der 24h-stimulierten Kultur direkt neben den Elektroden (links) mit einer unstimulierten Schwesterkultur (rechts), beide 13 DIV. Die Stimulation erfolgte alle 60 Sekunden mit einem biphasigen Einfachpuls der Amplitude $U=\pm 2.2$ V mit $t_{PB}=1.5$ ms.

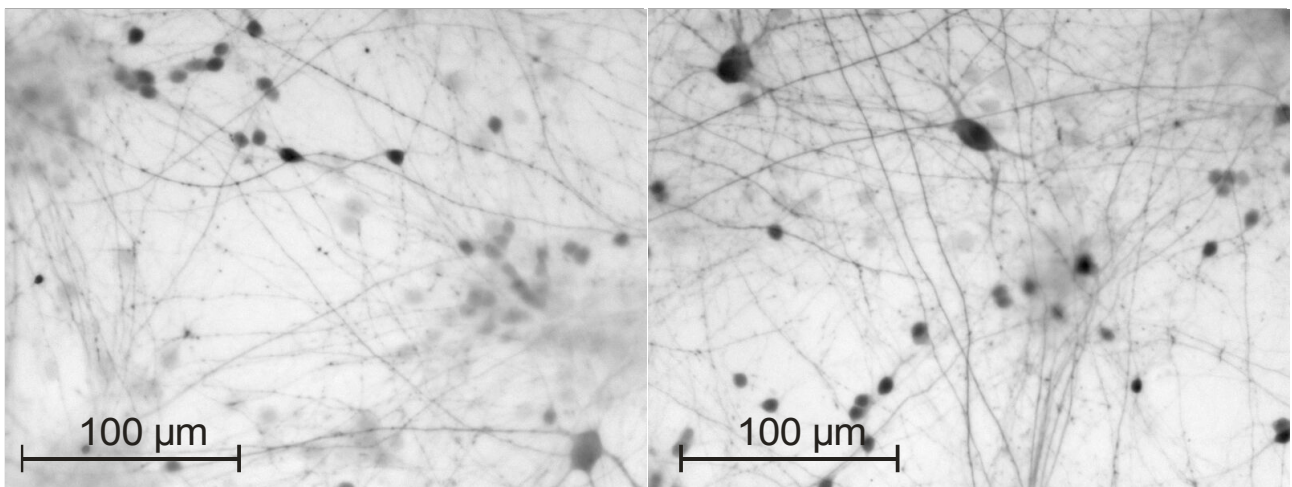


Abb. 8.5: Vergleich der 48h-stimulierten Kultur direkt neben den Elektroden (links) mit einer unstimulierten Schwesterkultur (rechts), beide 14 DIV. Die Stimulation erfolgte alle 60 Sekunden mit einem biphasigen Einfachpuls der Amplitude $U=\pm 2.2$ V mit $t_{PB}=1.5$ ms

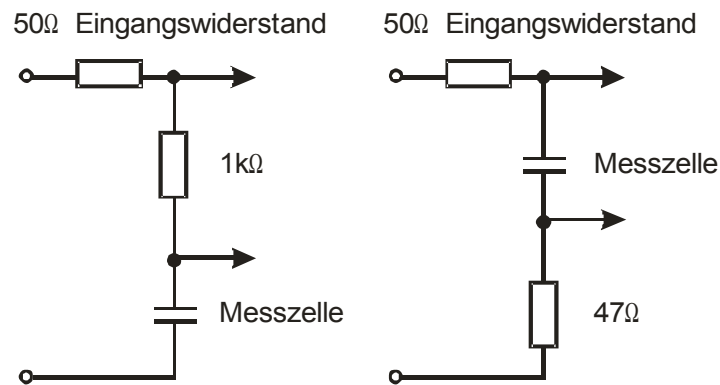


Abb. 8.6: Messaufbau zur Detektion von Stromspitzen (Tiefpass und Hochpass)
Die Pfeile repräsentieren die Messpunkte des Oszilloskops.

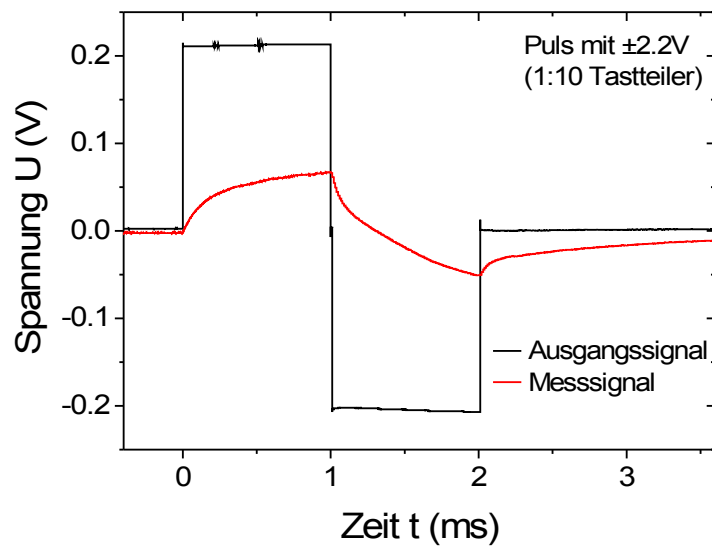


Abb. 8.7: Mit dem Tiefpass detektiertes Signal, keine Spannungsspitzen

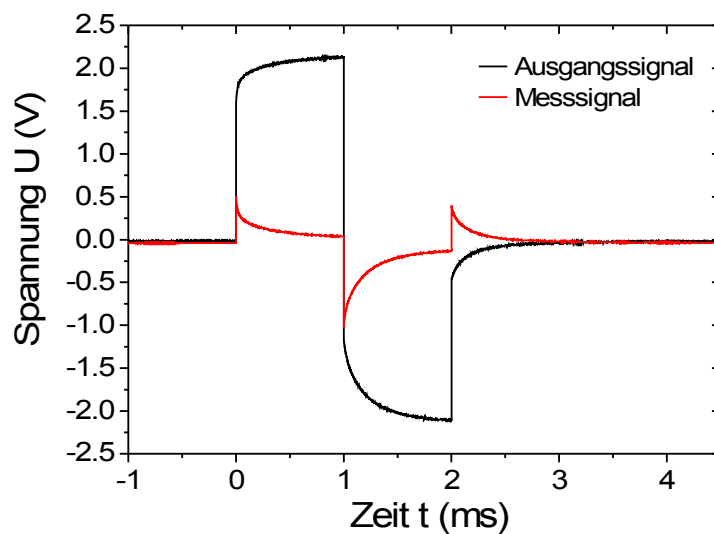


Abb. 8.8: Mit dem Hochpass detektiertes Signal, keine Spannungsspitzen

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name:	Antje Reiher
Geburtstag:	24.07.1978
Geburtsort:	Stendal
Anschrift:	Schillerstr. 5 39517 Tangerhütte
Staatsangehörigkeit:	Deutsch

Schulische Ausbildung

1985-1990	POS „Heinrich Rieke“ in Tangerhütte
1990-1997	„Altmärkisches Gymnasium“ Tangerhütte
1997	Abitur

Hochschulstudium

1997-2002	Studium der Physik (Diplom) an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
seit 19.11.02	akademischer Titel „Diplom-Physikerin“

Beruflicher Werdegang

11/02-04/05	wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Fakultät für Naturwissenschaften, Institut für Experimentelle Physik, Abteilung Halbleiterepitaxie
05/05-07/05	Graduierten-Stipendium des Landes Sachsen-Anhalt
08/05-08/07	wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, Fakultät für Naturwissenschaften, Institut für Experimentelle Physik, Abteilung Halbleiterepitaxie

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht

- A. Reiher, S. Günther, A. Krtschil, H. Witte, T. Opitz, A. de Lima, T. Voigt und A. Krost (2005), In vitro stimulation of neurons by a planar Ti-Au-electrode interface, *Appl. Phys. Lett.* **86**, 103901
- A. Reiher, C. Warnke, S. Radoch, H. Witte, A. Krtschil, T. Mair, S.C. Müller und A. Krost, (2006), Electrical Stimulation of the Energy Metabolism in Yeast Cells Using a Planar Ti-Au-Electrode Interface, *J. Bioenerg. Biomembranes* **38**, 143

weitere Veröffentlichungen

- J. Bläsing, A. Reiher, A. Dadgar, A. Diez und A. Krost (2002), The origin of stress reduction by low-temperature AlN interlayers, *Appl. Phys. Lett.* **81**, 2722
- A. Dadgar, M. Poschenrieder, J. Bläsing, O. Contreras, F. Bertram, T. Riemann, A. Reiher, M. Kunze, I. Daumiller, A. Krtschil, A. Diez, A. Kaluza, A. Modlich, M. Kamp, J. Christen, F.A. Ponce, E. Kohn und A. Krost (2002), Bright future for GaN-on-Si, *Proceedings of the 202nd ECS meeting 2002, Vol. 2002-14*, 301
- A. Reiher, J. Bläsing, A. Dadgar, A. Diez und A. Krost (2003), Efficient stress relieve in GaN heteroepitaxy on Si(111) by low-temperature AlN interlayers, *J. Cryst. Growth* **248**, 536
- A. Dadgar, M. Poschenrieder, J. Bläsing, O. Contreras, F. Bertram, T. Riemann, A. Reiher, M. Kunze, I. Daumiller, A. Krtschil, A. Diez, A. Kaluza, A. Modlich, M. Kamp, J. Christen, F.A. Ponce, E. Kohn und A. Krost (2003), MOVPE growth of GaN on Si(111) substrates, *J. Cryst. Growth* **248**, 556

- A. Dadgar, M. Poschenrieder, A. Reiher, J. Bläsing, J. Christen, A. Krtschil, T. Finger, T. Hempel, A. Diez und A. Krost (2003), Reduction of stress at the initial stages of GaN growth on Si(111), *Appl. Phys. Lett.* **82**, 28
- A. Dadgar, M. Poschenrieder, I. Daumiller, M. Kunze, A. Strittmatter, T. Riemann, F. Bertram, J. Bläsing, F. Schulze, A. Reiher, A. Krtschil, O. Contreras, A. Kaluza, A. Modlich, M. Kamp, L. Reißmann, A. Diez, J. Christen, F.A. Ponce, D. Bimberg, E. Kohn und A. Krost (2003), Gallium-nitride-based devices on silicon, *phys. stat. sol. (c)* **0**, 1940
- A. Dadgar, A. Strittmatter, J. Bläsing, M. Poschenrieder, O. Contreras, P. Veit, T. Riemann, F. Bertram, A. Reiher, A. Krtschil, A. Diez, T. Hempel, T. Finger, A. Kasic, M. Schubert, D. Bimberg, F. A. Ponce, J. Christen und A. Krost (2003), Metalorganic chemical vapor phase epitaxy of gallium-nitride on silicon, *phys. stat. sol. (c)* **0**, 1583
- A. Reiher, J. Bläsing, A. Dadgar und A. Krost (2004), Depth-resolving structural analysis of GaN layers by skew angle x-ray diffraction, *Appl. Phys. Lett.* **84**, 15

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Nutzung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel erarbeitet und verfasst zu haben.

Magdeburg, den 24.05.2007